

**Molekulare, zellbiologische und phylogenetische Analysen von Genen
des eukaryotischen Primärstoffwechsels.
Evolution der Glucose-6-phosphat Isomerase und des cytosolischen
sowie plastidären Stoffwechselwegs zur Isoprenoid-Biosynthese.**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Carina Grauvogel

aus Saarbrücken

1. Referent: Professor Dr. Rüdiger Cerff
2. Referent: apl. Professor Dr. Jörn-Michael Wettern
eingereicht am: 08.01.2007
mündliche Prüfung (Disputation) am: 07.06.2007

Druckjahr 2007

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikation

Grauvogel C, Reece KS, Brinkmann H, Petersen J (2006). Plastid isoprenoid metabolism in the oyster parasite *Perkinsus marinus* connects dinoflagellates and malaria pathogens - new impetus for studying alveolates. J Mol Evol, eingereicht.

Tagungsbeiträge

Grauvogel C, Petersen J (2005). Glykolytische Gene und der Ursprung komplexer Algen. 10. wissenschaftliche Tagung der Sektion Phykologie in der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Königswinter. (Vortrag)

Teich R, Grauvogel C, Cerff R, Petersen J (2004). The Phylogenetic Position of Haptophytes according to Genes for the Primary Metabolism. Botanikertagung, Braunschweig. (Poster)

The Secret Sits

We dance round in a ring and suppose,
But the Secret sits in the middle and knows.

Robert L. Frost
A Witness Tree, 1942

Inhaltsverzeichnis

Kapitel		Seite
1	Einleitung.....	1
1.1	Die Endosymbionten-Theorie.....	1
1.2	Die Evolution eukaryotischer Algen - Primäre und sekundäre Endosymbiose.....	5
1.3	Der Ursprung komplexer Algen mit rotem Plastiden - "Chromista" und Alveolata.....	7
1.3.1	Die Haptophyten.....	8
1.3.2	Die Diatomeen.....	9
1.4	Proteintransport über Plastidenmembranen.....	11
1.4.1	Proteinimport in die komplexen Plastiden der Diatomee <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	11
1.5	Die Glucose-6-phosphat Isomerase als wirtszell-spezifischer Marker der Evolution.....	13
1.6	Biosynthese von Isopentenyl Pyrophosphat (IPP).....	14
1.6.1	Der Mevalonat (MVA)-Weg der IPP-Biosynthese.....	15
1.6.2	Der Methylerythritol Phosphat (MEP)-Weg der IPP-Biosynthese.....	18
1.6.3	Verbreitung von MVA- und MEP-Pathway.....	20
1.7	Zielsetzung dieser Arbeit.....	23
2	Material und Methoden.....	25
2.1	Geräte.....	25
2.2	Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Enzyme.....	26
2.3	Kommerzielle Reagenzsätze (Kits).....	27
2.4	Arbeiten mit <i>E. coli</i>	27
2.5	Plasmid- und Bakteriophagen-Vektoren.....	28
2.6	In dieser Arbeit verwendetes Algen-Zellmaterial.....	28
2.6.1	Herkunft des Algenmaterials.....	28
2.6.2	Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Algenspezies.....	28
2.7	Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	29
2.7.1	Standard-Methoden beim Arbeiten mit DNA.....	29
2.7.2	Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	29
2.7.3	Arbeiten mit RNA.....	30
2.7.3.1	Grundlagen des Arbeitens mit RNA.....	30

Inhaltsverzeichnis

2.7.3.2	Isolation von Gesamt-RNA aus verschiedenen Algenspezies.....	30
2.7.3.3	Konzentrationsmessung von RNA-Präparationen.....	30
2.7.3.4	Aufreinigung von poly(A) ⁺ -RNA aus verschiedenen Algenspezies.....	31
2.8	RT-PCR Experimente zur partiellen Amplifikation von Transkripten für die GPI, den cytosolischen und den plastidären Weg der IPP-Biosynthese.....	31
2.8.1	Erstellung von Aminosäure-Alignments zur Konzeption degenerierter Primer.....	31
2.8.2	Konzeption degenerierter Primer zur Amplifikation unbekannter Transkripte der GPI und der Gene der IPP-Biosynthesewege.....	32
2.8.3	Konzeption sequenzspezifischer Primer zur Amplifikation von Transkripten der GPI und der IPP-Biosynthese.....	33
2.8.4	Durchführung von RT-PCR Experimenten.....	33
2.9	Screening von genomischen und cDNA-Banken zur Isolierung von Genen für die GPI, die DXR und die HMGR.....	34
2.10	Sequenzierung von DNA.....	35
2.11	Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Proteinen der IPP-Biosynthesewege in <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	35
2.11.1	Der <i>Phaeodactylum</i> Transformations-Vektor pPha-T1.....	36
2.11.2	Herstellung von eGFP-Reportergen-Konstrukten zur Untersuchung der Lokalisation der DXS, DXR und HMGR in <i>Phaeodactylum</i>	37
2.11.3	Stabile genetische Transformation von <i>Phaeodactylum</i> mittels Helium-Partikel-Kanone.....	38
2.11.4	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung und fotografische Dokumentation transformierter <i>Phaeodactylum</i> -Zellen mittels eines konfokalen Laserscanning Mikroskops.....	39
2.11.5	Nachweis der Reportergen-Konstrukte in transformierten <i>Phaeodactylum</i> -Zellen.....	39
2.12	Phylogenetische Analysen.....	40
3	Ergebnisse.....	41
3.1	<i>In silico</i> Etablierung von Referenz-Sequenzen und Erstellung von Aminosäure-Alignments.....	41
3.2	Konzeption degenerierter Primer zur Amplifikation von unbekannten Genfragmenten.....	43
3.3	Die Verbreitung der Glucose-6-phosphat Isomerase in den Plantae, den Alveolata und den "Chromista".....	44

Inhaltsverzeichnis

3.3.1	Etablierung einer cytosolischen und einer partiellen plastidären GPI aus der Grünalge <i>Mesostigma viride</i>	44
3.3.2	Isolierung und Sequenzierung von Genen für die GPI aus <i>Cyanophora paradoxa</i> , <i>Pyrocystis lunula</i> , <i>Lingulodinium polyedrum</i> , <i>Paramecium tetraurelia</i> und <i>Hanusia phi</i>	45
3.3.3	Etablierung einer GPI aus <i>Emiliania huxleyi</i>	46
3.3.4	<i>In silico</i> Etablierung weiterer GPI-Sequenzen.....	46
3.3.5	Identifizierung einer N-terminalen Extension in GPI-Sequenzen der Plantae.....	48
3.3.6	Konservierte Introns in den Genen der cytosolischen und der plastidären GPI der Plantae.....	49
3.3.7	Phylogenetische Analysen der etablierten Glucose-6-phosphat Isomerasen.....	51
3.3.7.1	Verbreitung und Ursprung der cytosolischen und der plastidären GPI der Plantae.....	55
3.3.7.2	Verbreitung und Ursprung der GPI in den Alveolata und den "Chromista".....	57
3.4	Die Verbreitung der beiden IPP-Biosynthesewege in den Plantae.....	61
3.4.1	<i>In silico</i> Etablierung der Gene für den MEP-Weg aus den Grünalgen <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> und <i>Volvox carteri</i>	61
3.4.2	Isolierung und Sequenzierung zweier Klone für die HMGS aus <i>Chara vulgaris</i>	62
3.4.3	Vorkommen des MEP- und des MVA-Wegs in <i>Mesostigma viride</i> und <i>Cyanophora paradoxa</i>	62
3.4.4	Amplifikation einer fast vollständigen HMGS aus <i>Mesostigma viride</i> durch Kombination von degenerierten und genspezifischen Primern.....	64
3.4.5	<i>In silico</i> Etablierung von Sequenzen des MEP- und des MVA-Wegs aus den Rotalgen <i>Cyanidioschyzon merolae</i> und <i>Galdieria sulphuraria</i> ..	66
3.4.6	Identifizierung und Sequenzierung von Genen des MEP-Wegs aus der Rotalge <i>Porphyra yezoensis</i>	66
3.4.7	Zusammenfassung der Verbreitung von MVA- und MEP-Weg in den Plantae.....	67
3.5	Die Verbreitung der beiden IPP-Biosynthesewege in den Alveolata und "Chromista".....	68
3.5.1	<i>In silico</i> Etablierung von Sequenzen des MEP-Wegs aus den Apicomplexa.....	68

Inhaltsverzeichnis

3.5.2	<i>In silico</i> Etablierung von Sequenzen des MVA-Wegs aus den Ciliaten <i>Paramecium tetraurelia</i> und <i>Tetrahymena thermophila</i>	69
3.5.3	Isolierung und Sequenzierung des Gens für die DXR aus dem Dinophyten <i>Pyrocystis lunula</i>	69
3.5.4	<i>In silico</i> Etablierung von Sequenzen des MEP-Wegs aus Dinophyten...	71
3.5.5	<i>In silico</i> Identifizierung des plastidären MEP-Wegs in dem Alveolaten <i>Perkinsus marinus</i>	71
3.5.6	<i>In silico</i> Etablierung von Sequenzen des MVA- und des MEP-Wegs aus den Stramenopilen <i>Phaeodactylum tricornutum</i> und <i>Thalassiosira pseudonana</i> (Diatomeen) sowie <i>Phytophthora ramorum</i> und <i>Phytophthora sojae</i> (Oomyceten).....	72
3.5.7	Isolierung und Sequenzierung einer vollständigen HMGR aus <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	72
3.5.8	Etablierung von Sequenzen des MEP-Wegs aus Cryptophyten.....	73
3.5.9	Etablierung von Sequenzen des MVA- und des MEP-Wegs aus den Haptophyten <i>Prymnesium parvum</i> und <i>Pavlova lutheri</i>	73
3.5.10	PCR-Amplifikation von Genfragmenten für Enzyme des MVA- und des MEP-Wegs aus dem Haptophyten <i>Emiliana huxleyi</i>	74
3.5.11	Zusammenfassung der Verbreitung von MVA- und MEP-Weg in den Alveolata und "Chromista".....	77
3.6	Untersuchung der subzellulären Lokalisation der HMGR, DXS und DXR in <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	78
3.7	Phylogenetische Analyse der Gene für die Enzyme des cytosolischen MVA-Wegs der IPP-Biosynthese.....	82
3.7.1	Phylogenetische Analyse der HMGS (cyt-1).....	82
3.7.2	Evolution des MVA-Wegs in Streptophyta und Rhodophyta (Plantae)....	86
3.7.3	Die Sequenzen aus den Ciliaten lassen keine phylogenetische Zuordnung zu.....	87
3.7.4	Monophyletischer Ursprung der Stramenopilen.....	87
3.7.5	Assoziation der Stramenopilen mit dem Haptophyten <i>Emiliana huxleyi</i>	88
3.8	Phylogenetische Analyse der Gene für die Enzyme des plastidären MEP-Wegs der IPP-Biosynthese.....	89
3.8.1	Phylogenetische Analyse der DXR (pla-2).....	90
3.8.2	Phylogenetische Analyse der HDR (pla-7).....	94
3.8.3	Ursprung der Gene des MEP-Wegs in den Plantae	96
3.8.4	Die Sequenzen aus den Apicomplexa lassen keine eindeutige phylogenetische Zuordnung zu.....	97

Inhaltsverzeichnis

3.8.5	Monophyletischer Ursprung der Gene für den plastidären MEP-Weg in den "Chromista".....	98
4	Diskussion.....	101
4.1	Multiple Entstehung und heterogene Verteilung der plastidären GPI.....	101
4.2	Die cytosolische GPI als Marker der Wirtszelle - Implikationen für die Evolution der Algen.....	103
4.3	Existenz des MVA-Wegs in <i>Mesostigma</i> und <i>Cyanophora</i> - Implikationen für die ursprüngliche Verbreitung des Pathways in den Plantae.....	106
4.4	Der MEP-Weg als plastidärer Marker unterstützt einen monophyletischen Ursprung der Plastiden der "Chromista".....	108
4.5	Phylogenie des MVA-Wegs - Implikationen für die Evolution der komplexen Algen.....	109
4.6	Identifizierung des MEP-Wegs in <i>Perkinsus</i> - Indiz für einen Plastiden im Austernparasiten.....	111
5	Zusammenfassung.....	113
6	Literatur.....	115
7	Anhang.....	135
7.1	In dieser Arbeit verwendete degenerierte PCR-Primer.....	135
7.2	In dieser Arbeit verwendete genspezifische PCR-Primer.....	137
7.3	Accession Nummern der in dieser Arbeit etablierten Gensequenzen.....	139
7.3.1	Accession Nummern der etablierten Glucose-6-phosphat Isomerasen...	139
7.3.2	Accession Nummern der etablierten Gene für die IPP-Biosynthese.....	139
7.4	Sequenz des RT-PCR-Amplifikats der plastidären GPI aus <i>Mesostigma viride</i>	141
7.5	Sequenzen der RT-PCR-Amplifikate von Genen des plastidären MEP-Wegs der IPP-Biosynthese aus <i>Cyanophora paradoxa</i>	142
7.5.1	Sequenz des RT-PCR-Amplifikats der DXR (pla-2) aus <i>Cyanophora</i>	142
7.5.2	Sequenz des RT-PCR-Amplifikats der MCT (pla-3) aus <i>Cyanophora</i>	143
7.5.3	Sequenz des RT-PCR-Amplifikats der MECPS (pla-5) aus <i>Cyanophora</i>	144
7.5.4	Sequenz des RT-PCR-Amplifikats der HDS (pla-6) aus <i>Cyanophora</i>	144
7.5.5	Sequenz des RT-PCR-Amplifikats der HDR (pla-7) aus <i>Cyanophora</i>	145
7.6	TRACE Identity (TI) Nummern der genomischen TRACE-Files aus <i>Emiliana huxleyi</i>	147

Inhaltsverzeichnis

7.7	Sequenzen der in <i>Phaeodactylum</i> transformierten eGFP-Reportergen-Konstrukte.....	148
7.7.1	Sequenz des Kontroll-Amplifikats des HMGR-Konstrukts.....	148
7.7.2	Sequenz des Kontroll-Amplifikats des DXS-Konstrukts.....	150
7.7.3	Sequenz des Kontroll-Amplifikats des DXR-Konstrukts.....	150
7.8	Phylogenetische Analysen der Gene für Enzyme des MVA- und des MEP-Wegs der IPP-Biosynthese.....	153
7.8.1	Phylogenetische Analyse der HMGR (cyt-2).....	154
7.8.2	Phylogenetische Analyse der MK (cyt-3).....	156
7.8.3	Phylogenetische Analyse der PMK (cyt-4).....	158
7.8.4	Phylogenetische Analyse der MDD (cyt-5).....	160
7.8.5	Phylogenetische Analyse der DXS (pla-1).....	162
7.8.6	Phylogenetische Analyse der MCT (pla-3).....	164
7.8.7	Phylogenetische Analyse der CMK (pla-4).....	166
7.8.8	Phylogenetische Analyse der MECPS (pla-5).....	168
7.8.9	Phylogenetische Analyse der HDS (pla-6).....	170

In dieser Arbeit verwendete Abkürzungen

A	Adenin
Acc.	Accession
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar(e)
BP	Bootstrap Proportions
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	complementary DNA
CER	chloroplastidäres Endoplasmatisches Reticulum
CMK	4-(Cytidin 5-diphospho)-2-C-Methyl-D-erythritol Kinase
cyt-1, -2, ...-5	1., 2., ... 5. Enzym des cytosolischen MVA-Pathways
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	desoxy-Cytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMAPP	Dimethylallyl Pyrophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DOE	Department of Energy der USA
DXP	1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat
DXR	1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Reductoisomerase
DXS	1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphat Synthase
E	Einstein
EC	Enzyme Commission
eGFP	enhanced green fluorescent protein
EGT	endosymbiotischer Gentransfer
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EST	expressed sequence tag
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
EtOH	Ethanol
FBA	Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase
FBP	Fructose-1,6-Bisphosphatase

Abkürzungsverzeichnis

fcpA/B	Fucoxanthin Chlorophyll a/b bindendes Protein
g	Gramm
g	gravity
G	Guanin
GAP(DH)	Glycerinaldehyd-3-phosphat (Dehydrogenase)
GFP	green fluorescent protein
GPI(pla/cyt)	(plastidäre/cytosolische) Glucose-6-phosphat Isomerase
h	Stunde
HDR	4-Hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl Diphosphat Reductase
HDS	4-Hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl Diphosphat Synthase
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
HMGR	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase
HMGS	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Synthase
Hsp	heat shock protein
inkl.	inklusive
IPP	Isopentenyl Pyrophosphat
JGI	Joint Genome Institute
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
LB	lysogeny broth
LBA	long branch attraction
LSM	Laserscanning Mikroskop
m	Milli
M	Molar
μ	Micro
Mbp	Megabasenpaare
MCT	2-C-Methyl-D-erythritol 4-phosphat Cytidyltransferase
MDD	Mevalonat 5-diphosphat Decarboxylase
MECPS	2-C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphat Synthase
MEP	2-C-Methyl-D-erythritol 4-phosphat
min	Minute(n)
MK	Mevalonat Kinase
ML	Maximum Likelihood
mRNA	messenger RNA
MVA	mevalonic acid
n	Nano

Abkürzungsverzeichnis

NADP	Nikotinsäureamid Adenin Dinukleotid (Phosphat)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nr.	Nummer(n)
nt	Nukleotid(e)
OD	optische Dichte
OPPP	Oxidativer Pentose-Phosphat Pathway
PCR	Polymerase Chain Reaction
pers.	persönliche
pfu	plaque forming units
phyML	Phylyp Maximum Likelihood
pla-1,-2, ...-7	1., 2., ... 7. Enzym des plastidären MEP-Pathways
PMK	5-Phosphomevalonat Kinase
PPM	periplastidäre Membran
PRK	Phosphoribulokinase
ptFD	plant-type Ferredoxin
ptFNR	plant-type Ferredoxin-NADP ⁺ Reductase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction
s	Sekunde
SAG	Sammlung für Algenkulturen der Universität Göttingen
SBP	Seduheptulose Bisphosphatase
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SOC	Super Optimal Catabolyte repression
SSU	small subunit
T	Thymin
TF	Treefinder
Tic	translocon on the inner envelope of chloroplasts
TIGR	The Institute for Genomic Research, MD, USA
Toc	translocon on the outer envelope of chloroplasts
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
UK	United Kingdom
USA	United States of America

1 Einleitung

1.1 Die Endosymbionten-Theorie

Bereits 1883 postulierte der deutsche Botaniker Andreas Schimper, dass die Plastiden der Pflanzen ursprünglich frei lebende Organismen seien, die von einer anderen Zelle als Symbionten aufgenommen wurden (Schimper 1883). Er stützte seine Überlegung auf die Beobachtung, dass diese Zellorganellen nie *de novo* entstehen, sondern sich stets durch Teilung vermehren. Schimpers Feststellung stand in scharfem Kontrast zur Darwinschen Lehre, nach der die Evolution der Arten einen hierarchisch gegliederten, linearen Prozess darstellt (Darwin 1859). Sie lieferte jedoch eine plausible Erklärung für bis dato unverständliche Sprünge in der Evolution wie z. B. die Entstehung der phototrophen Eukaryoten, und war die Geburtsstunde der Endosymbioseforschung. Der russische Biologe Constantin Mereschkowsky stellte dann zu Beginn des 20. Jahrhunderts die Hypothese auf, dass manche Organismen durch die intrazelluläre Vereinigung zweier verschiedener Zellarten entstanden sind (Mereschkowsky 1905, 1910). Er konstatierte, dass Plastiden gleichzusetzen sind mit reduzierten Cyanobakterien ("Chromatophoren"), die früh in der Evolution eine Symbiose mit einer heterotrophen Wirtszelle eingingen, und dass die Photoautotrophie der Pflanzen ausschließlich auf diese Endosymbionten zurückzuführen ist (Abb. 1). Mereschkowsky legte den Grundstein für die heutige Endosymbionten-Theorie, die seit ihrer Wiederbelebung durch Lynn Margulis (1970) als eine der treibenden Kräfte der eukaryotischen Evolution angesehen wird. Die heutige Evolutionsforschung fußt auf den wissenschaftlichen Errungenschaften der Molekularbiologie und den Fortschritten in der Bioinformatik. Dabei ermöglicht die Entschlüsselung der genetischen Information durch moderne Sequenzierungstechniken und ihre Analyse durch Computer-Programme ganz neue Einsichten in die Verwandtschafts-Beziehungen der Arten und Organellen.

Die heutige Endosymbionten-Theorie umfasst alle Ereignisse, welche zur Entstehung der Abteilungen der Eukaryoten geführt haben. Dabei sind durch die Vereinigung vorher selbständiger Organismen neuartige Zellen entstanden.

1 Einleitung

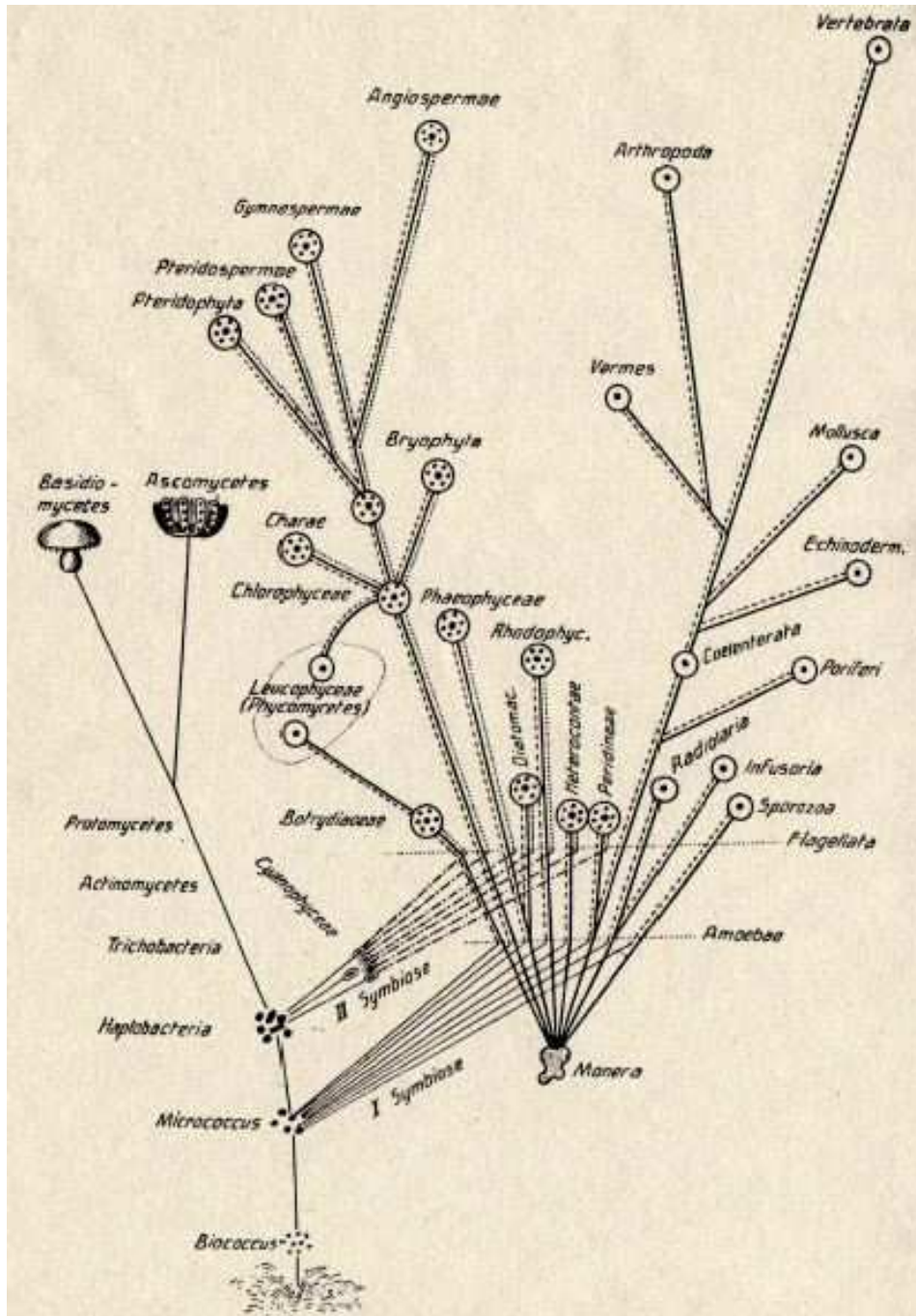


Abb. 1: Entstehung der "organischen Welt" nach Mereschkowsky (1910). Mereschkowsky ging von zwei unabhängigen Ereignissen bei der Entstehung von Leben aus. Demnach entstanden erst die "Urbakterien" (linker Stamm), die sich später zu den Cyanophyceen und zu den Pilzen weiterentwickelten. Später entstanden amöboide Zellen, die Bakterien als Symbionten aufnahmen und zum Zellkern bzw. zum Plastiden rekrutierten. Hieraus entwickelten sich die Tiere und Pflanzen.

Die ersten eukaryotischen Organismen haben vor ca. 2 Milliarden Jahren existiert (Feng *et al.* 1997, Hedges *et al.* 2004). Nach der „Wasserstoff-Hypothese“ (Martin und Müller 1998) geht ihre Entstehung einher mit dem Ursprung der Mitochondrien, also mit einem endosymbiotischen Ereignis, bei dem ein Vorläufer der heutigen α -Proteobakterien (Doolittle 1996, Horner *et al.* 1996) als Endosymbiont von einem wahrscheinlich

1 Einleitung

methanogenen Archaeon aufgenommen wurde, welches Wasserstoff (H_2) als Energiequelle nutzte. Treibende Kraft für die Entstehung der Endosymbiose war dabei die Wasserstoff-Abhängigkeit des strikt anaeroben Archaeon von dem Eubakterium, welches zur Atmung befähigt war und unter anaeroben Bedingungen Wasserstoff produzierte. Ein zunehmender physikalischer Kontakt der beiden Zellen resultierte schließlich in einer vollständigen Umschließung des Eubakteriums durch die archaeale Zelle.

Die Ur-Eukaryoten ernährten sich Kohlenstoff-heterotroph. Photosynthetische Eukaryoten, die Lichtenergie in chemische Energie umzuwandeln und in Form von reduzierten Kohlenstoff-Verbindungen zu speichern vermögen, sind vor ca. 1 bis 1,5 Milliarden Jahren entstanden (Hedges *et al.* 2004, Yoon *et al.* 2004), als durch ein weiteres endosymbiotisches Ereignis ein photosynthetisch aktives Cyanobakterium von einer eukaryotischen Wirtszelle aufgenommen und als photoautotropher Energielieferant rekrutiert wurde (Bhattacharya 1997, McFadden 2001).

Viele Eigenschaften der Mitochondrien und Plastiden erinnern heute noch an ihren Ursprung. Beide Organellen verfügen über ein eigenes Genom sowie einen eigenen Transkriptions- und Translationsapparat. Dabei besteht das Genom aus einem zirkulären DNA-Molekül vergleichbar mit dem der Prokaryoten, die für Eukaryoten typischen assoziierten Histone fehlen. Die Transkription in den Plastiden wird genspezifisch entweder von einer plastidär kodierten RNA-Polymerase des prokaryotischen Typs (PEP, plastid encoded RNA polymerase) oder von einer nukleär kodierten eukaryotischen RNA-Polymerase (NEP, nuclear encoded RNA polymerase) katalysiert (Allison *et al.* 1996): Auch die Ribosomen der Organellen sind vom bakteriellen 70S-Typ.

Der Vorteil eines Endosymbionten für den Wirt besteht im Erwerb zusätzlicher Fähigkeiten, die z. B. eine effizientere Nutzung von Nahrungsressourcen (durch den aeroben Abbau von Zuckerverbindungen über die Atmungskette in den Mitochondrien) oder eine weitgehende Unabhängigkeit davon (durch photoautotrophe Kohlenstoff (C) - Fixierung in den Plastiden) ermöglichen. Die rekrutierten Endosymbionten brachten neben einigen für den Wirt nützlichen Stoffwechselwegen aber auch solche mit, die in der Wirtszelle bereits vorhanden waren. Die meisten redundanten Eigenschaften gingen aufgrund des mangelnden Selektionsdrucks im Laufe der Evolution in den Organellen verloren. So sind die heutigen Mitochondrien und Chloroplasten im Vergleich zu ihren selbständigen Vorfahren in ihrer Funktion erheblich reduziert. Auch die Genome der heutigen Organellen enthalten nur noch Bruchteile des Genoms ihres Vorfahren, das Plastidengenom der Rotalge *Porphyra purpurea* enthält z. B. nur ca. 8% der Gene des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC6803 (Delwiche 1999). Die Plastome (= Plastidengenome) heutiger Landpflanzen kodieren noch für ca. 50-150 Proteine (Leister

1 Einleitung

2003), wohingegen die kleinsten bekannten cyanobakteriellen Genome ca. 1900 Proteine kodieren (Dufresne *et al.* 2003). Ursache für diese Reduktion war zum einen ein Verlust cyanobakterieller Gene, deren Produkte bedingt durch die neuen Umweltbedingungen überflüssig geworden waren. Ein prominentes Beispiel hierfür ist die cyanobakterielle Zellwand, die in den meisten Plastiden nicht mehr vorhanden ist. Des Weiteren kam es zu einer Substitution cyanobakterieller Gene durch homologe Gene des Wirts. Hierbei fand eine Duplikation des kernkodierten, cytosolisch transkribierten Wirts-Gens statt, dessen Produkt in den Plastiden transportiert wird (Martin und Schnarrenberger 1997). Drittens gab es einen massiven lateralen endosymbiotischen Gentransfer (EGT) vom Genom des Endosymbionten in das des Wirtes (Martin & Herrmann 1998, Martin *et al.* 2002, Stegemann *et al.* 2003). So haben z. B. ca. 18% aller Gene im Kerngenom von *Arabidopsis thaliana* einen cyanobakteriellen Ursprung (Martin *et al.* 2002).

Grundvoraussetzung für den Ersatz organell-kodierter Proteine durch nukleär kodierte ist ein Import-System für Proteine, deren Gene kernkodiert sind und die im Cytoplasma translatiert werden. Erst wenn ein im Kern kodiertes Protein an seinen Wirkungsort im Organell zurück transportiert wird und dort seine Funktion erfüllen kann, ist eine Deletion des entsprechenden Organellen-Gens ohne Funktionsverlust möglich. Die mehrfache Etablierung solcher Protein-Import-Maschinerien im Zuge der Endosymbiosen ist eine bemerkenswerte Errungenschaft eukaryotischer Organismen. Sie beinhaltet die Entwicklung von Translokationskomplexen in den Hüllmembranen der Organellen sowie die Erweiterung der Aminosäuresequenzen der entsprechenden Proteine um eine Transitsequenz, durch die der Transport zum jeweiligen Organell und der Eintritt durch die Membranen gewährleistet werden. Plastidär lokalisierte Proteine enthalten ein N-terminales Transitpeptid mit einer Länge von ca. 25-100 Aminosäuren (Foth *et al.* 2003). Es wird nach dem Transport des Präproteins durch die Plastidenmembran von einer Protease abgespalten. Die Notwendigkeit der Etablierung solcher Proteinimport-Systeme ist wahrscheinlich die Ursache dafür, dass erfolgreiche Endosymbiose-Ereignisse sehr selten sind (Cavalier-Smith und Lee 1985).

Allerdings sind nicht alle Proteine endosymbiotischer Herkunft nach dem Transfer des Genes auch wieder an ihrem ursprünglichen Wirkungsort aktiv. Von den Genen cyanobakteriellen Ursprungs im *Arabidopsis*-Genom werden mehr als die Hälfte der Proteine heute nicht mehr in den Plastiden zurücktransportiert, sondern sind in anderen Zellkompartimenten lokalisiert (Martin *et al.* 2002). Umgekehrt sind Proteine im Plastiden aktiv, deren Gene nicht von seinem cyanobakteriellen Vorläufer erworben wurden. Neben der chimären Zusammensetzung eukaryotischer Genome (s. o.) gibt es folglich einen mosaikartigen Aufbau von Stoffwechselwegen aus Proteinen verschiedener Herkunft, wie

z. B. für den plastidären Calvin Zyklus höherer Pflanzen beschrieben (Martin und Schnarrenberger 1997).

1.2 Die Evolution eukaryotischer Algen – Primäre und sekundäre Endosymbiose

Die heutige Vielfalt eukaryotischer Algenabteilungen (Abb. 2) lässt sich auf mehrere endosymbiotische Ereignisse zurückführen (Douglas 1998, Delwiche 1999). Man unterscheidet dabei abhängig vom Mechanismus zwischen primären (eukaryotisch-prokaryotischen) und sekundären bzw. tertiären (eukaryotisch-eukaryotischen) Endosymbiosen.

Bei der primären Endosymbiose wurde ein Cyanobakterium von einer eukaryotischen Wirtszelle aufgenommen (McFadden 2001). Die daraus entstandenen primären Plastiden sind von zwei Hüllmembranen umgeben, von denen sich die innere auf eine der beiden Zellmembranen des Cyanobakteriums zurückführen lässt. Die äußere Hüllmembran enthält sowohl eukaryotische als auch prokaryotische Komponenten (Reumann und Keegstra 1999, Vothknecht und Soll 2005). Es wird heute allgemein akzeptiert, dass die Entstehung der photosynthetischen Eukaryoten auf eine einzige primäre Endosymbiose mit einem Cyanobakterium zurückzuführen ist (Bhattacharya und Medlin 1995, Douglas 1998). Aus ihr ist die Gruppe der Plantae (Cavalier-Smith 1981) hervorgegangen, zu denen die drei rezenten Linien der Chlorophyta (Grünalgen)/Streptophyta (inkl. der Landpflanzen), der Rhodophyta (Rotalgen) und der Glaucophyta gezählt werden (Rodríguez-Ezpeleta *et al.* 2005).

Durch sekundäre Endosymbiosen entstandene photosynthetische Eukaryoten (Abb. 2) besitzen komplexe Plastiden (Delwiche und Palmer 1997) mit drei bzw. vier Hüllmembranen und sind durch die Aufnahme eines photosynthetischen Eukaryoten (einer Alge) durch eine eukaryotische Wirtszelle entstanden. Chlorarachniophyta und Cryptophyta besitzen im periplastidären Kompartiment (zwischen den beiden inneren und den beiden äußeren Membranen) des Plastiden noch das Nukleomorph, einen Rest des Nukleus des primären Wirtes. Bei den Chlorarachniophyten ist es das Relikt einer endosymbiotischen Grünalge (van de Peer *et al.* 1996), bei den Cryptophyten stammt es von einer Rotalge ab (Liaud *et al.* 1997, Douglas *et al.* 2001). Euglenophyta und Chlorarachniophyta sind unabhängig durch die Aufnahme einer Grünalge entstanden, wohingegen bei den Haptophyta, Heterokontophyta (z. B. Diatomeen), Cryptophyta und den Peridinin-haltigen Dinophyta eine Rotalge rekrutiert wurde (Abb. 2).

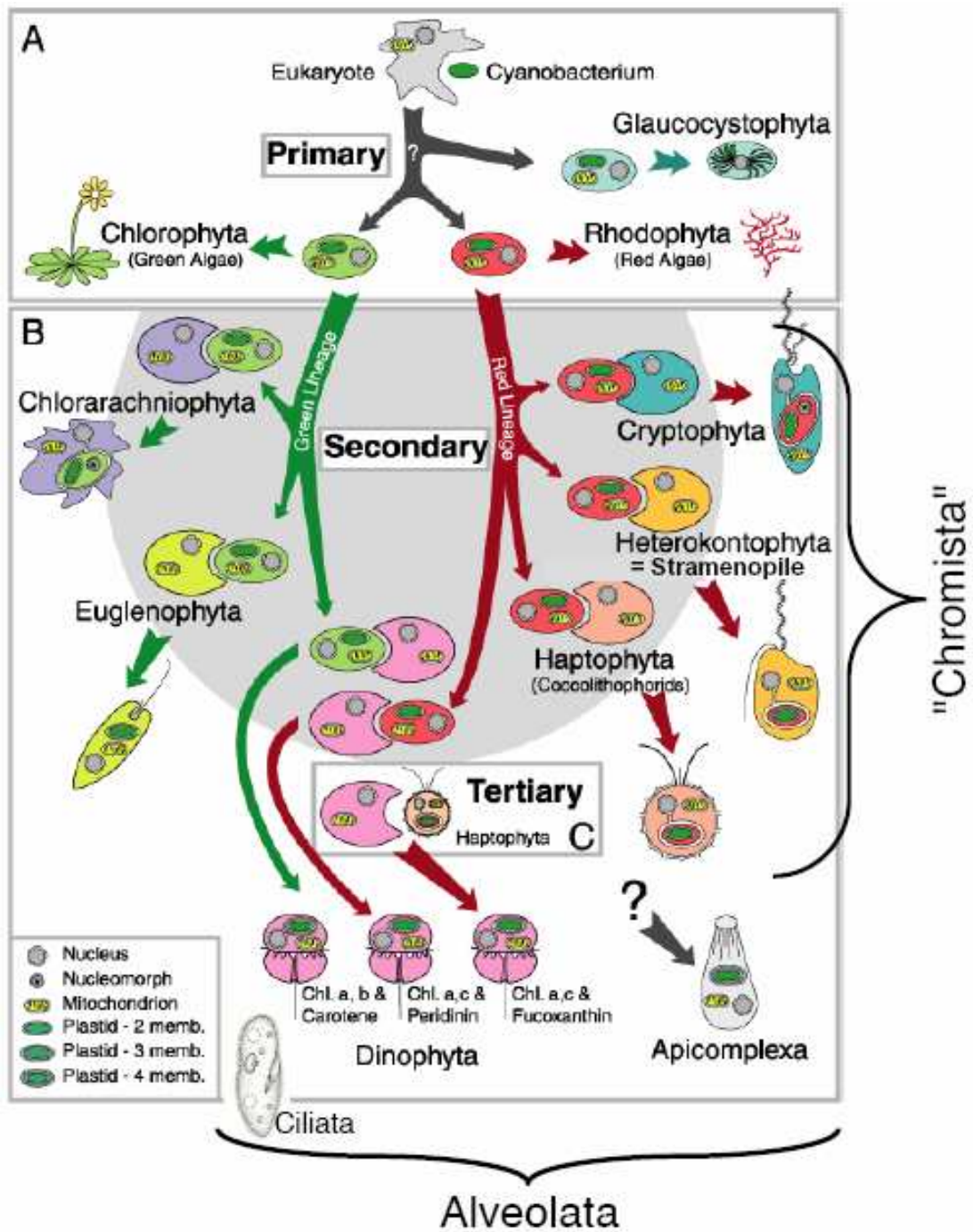


Abb. 2: Entstehung eukaryotischer Algen durch primäre und sekundäre Endosymbiosen. Verändert nach Delwiche CF (1999).

1.3 Der Ursprung komplexer Algen mit rotem Plastiden – "Chromista" und Alveolata

Während ein monophyletischer Ursprung der Plantae als gesichert gilt, wird bis heute kontrovers diskutiert, ob die verschiedenen Gruppen der Algen mit komplexem "rotem" Plastiden ebenfalls aus einer einzigen sekundären Endosymbiose mit einer Rotalge hervorgegangen sind, oder ob es mehrere solcher Ereignisse gab (Yoon *et al.* 2002, Harper und Keeling 2003, Palmer 2003, Falkowski *et al.* 2004, Keeling *et al.* 2004, Harper *et al.* 2005, Petersen *et al.* 2006a, Teich *et al.* 2006).

Haptophyta, Heterokontophyta (= Stramenopile) und Cryptophyta werden aufgrund ihres Gehaltes an Chlorophyll c unter der operationalen Bezeichnung "Chromista" (Cavalier-Smith 1981) zusammengefasst. Molekulare Untersuchungen plastiden-spezifischer Marker wie den Enzymen des Calvin Zyklus legen einen gemeinsamen Ursprung der Plastiden dieser drei Gruppen sowie der Dinophyta nahe (Patron *et al.* 2004, Petersen *et al.* 2006a, Teich *et al.* 2006). Besonders die Existenz einer für komplexe rote Plastiden spezifischen Form der Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH), der GapC-I, in allen vier Gruppen ist ein starkes Argument für eine Monophylie dieser Plastiden (Liaud *et al.* 1997, 2000, Fagan *et al.* 1998, Fast *et al.* 2001, Harper und Keeling 2003).

Neben den Dinophyta als einzige photosynthetische Gruppe umfasst die Abteilung der Alveolata auch noch die heterotrophen Ciliaten, die parasitischen Apicomplexa, zu denen z. B. der Malariaerreger *Plasmodium* gehört, sowie die Perkinsea, deren namensgebender Vertreter *Perkinsus marinus* (vorher *Dermocystidium marinum*) verantwortlich ist für eine als "Dermo" bezeichnete Krankheit von Austern, welche massiven ökologischen und ökonomischen Schaden v. a. an der Ostküste der USA anrichtet. Die gemeinsame Klassifizierung dieser unterschiedlichen Organismengruppen beruhte ursprünglich auf morphologischen Merkmalen wie den namensgebenden Alveolen (Preisig *et al.* 1994), inzwischen gilt die Monophylie aller Alveolata auf Wirtszellebene auch durch molekulare Analysen als gesichert (Gajadhar *et al.* 1991, Budin und Philippe 1998, Rodríguez-Ezpeleta *et al.* 2005). Die Apicomplexa besitzen noch einen degenerierten Plastiden, den Apicoplasten (Wilson *et al.* 1996), der ihren ursprünglich photosynthetischen Ursprung belegt (McFadden *et al.* 1996). Dieses Organell hat zwar seine Fähigkeit zur Photosynthese verloren, verfügt jedoch noch über für die Zelle essentielle Stoffwechselwege wie z. B. die Isoprenoid-Biosynthese (Kap. 1.6). Der Ursprung dieses komplexen Plastiden durch eine sekundäre Endosymbiose wird allgemein akzeptiert. Es ist jedoch bisher nicht gesichert, ob er von einer Rotalge abstammt (Funes *et al.* 2002, Foth und McFadden 2003, Funes *et al.* 2003) oder auf eine Grünalge zurückzuführen ist (Waller *et al.* 2003). *Perkinsus* wurde ursprünglich ebenfalls

zu den Apicomplexa gezählt (Levine 1978, Perkins 1996), neuere Analysen von SSU rRNA, dem Hitzeschock-Protein Hsp90 und Strukturgenen legen jedoch eine enge Verwandtschaft mit den Dinophyta nahe (Reece *et al.* 1997, Saldarriaga *et al.* 2003, Leander und Keeling 2004). Bis vor kurzem konnten in diesem parasitischen Alveolaten keine Hinweise auf die (frühere) Existenz eines Plastiden gefunden werden.

Ein möglicher monophyletischer, photosynthetischer Ursprung der "Chromista" und Alveolata, wie durch plastiden-spezifische Marker (s. o.) impliziert, wird in der "Chromalveolat-Hypothese" diskutiert (Cavalier-Smith 1999). Allerdings wird eine Monophylie der Wirtszellen der "Chromista" bisher durch phylogenetische Untersuchungen nicht unterstützt, und es gibt auch keine Hinweise auf einen photosynthetischen Ursprung der Ciliaten (Eisen *et al.* 2006). Neben der Möglichkeit von mehreren unabhängigen sekundären Endosymbiosen mit Rotalgen könnten auch tertiäre Endosymbiosen eine Erklärung für diese anscheinenden Inkongruenzen zwischen plastidären und Wirtszell-Phylogenien liefern (Petersen *et al.* 2006a, Teich *et al.* 2006).

1.3.1 Die Haptophyta

Die Abteilung der Haptophyten ist eine vergleichsweise kleine Gruppe mariner Algen, zu der ca. 500 bisher bekannte Arten gehören (van den Hoek *et al.* 1993). Sie sind durch eine sekundäre Endosymbiose entstanden, bei der eine Rotalge als Endosymbiont aufgenommen und zum Plastiden reduziert wurde. Die Plastiden der Haptophyten sind von 4 Hüllmembranen umgeben. Sie enthalten die Photosynthese-Pigmente Chlorophyll a und c sowie Fucoxanthin als wichtigstes akzessorisches Pigment, welches die grüne Farbe des Chlorophylls überlagert und die Plastiden goldbraun erscheinen lässt. Haptophyten sind meist einzellige marine Organismen. Sie enthalten zusätzlich zu zwei Geißeln noch das namensgebende Haptonema, ein fadenförmiges Anhängsel, das der Anheftung der Zelle auf einer Oberfläche sowie dem Erbeuten von Nahrung dient. Manche Arten, z. B. *Prymnesium parvum*, sekretieren toxische Verbindungen, und ihre Algenblüten verursachen Massen-Fischsterben. Die Zellen der Haptophyten sind außen mit Polysaccharid-Schuppen besetzt. Bei den Vertretern der Ordnung Coccolithophorales sind sie verkalkt und werden als Coccolithen bezeichnet. Ihre Funktion ist bisher nicht vollständig geklärt, sie liegt eventuell im Fraßschutz, der Regulation des Auftriebs oder auch der Lichtzufuhr. Nach dem Absterben der Zelle sedimentieren diese Coccolithen und bilden Kalkgesteine. Ein beeindruckendes Beispiel hierfür sind die Kreidefelsen auf der Insel Rügen, die zum Großteil aus fossilen Coccolithen bestehen. Den Coccolithophorales

1 Einleitung

kommt daher eine wichtige Rolle im CO₂-Haushalt der Atmosphäre zu, weil sie dieses Treibhausgas als Calciumcarbonat dauerhaft binden.

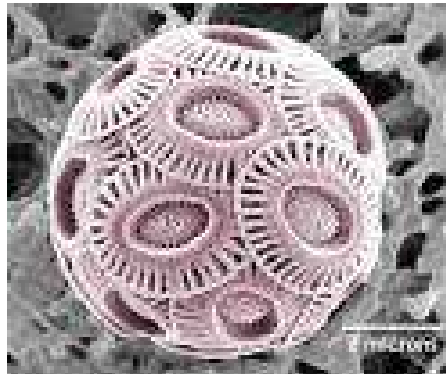


Abb. 3: *Emiliania huxleyi* gehört zu den Coccolithophorales. Die Polysaccharid-Schuppen auf der Zelloberfläche sind bei dieser Gruppe verkalkt und werden als Coccolithen bezeichnet. http://www.nhm.ac.uk/hosted_sites/ina/colourcoccos/source/

Der bekannteste Vertreter der Haptophyten ist *Emiliania huxleyi* (Abb. 3), die als "kosmopolitische" Alge weltweit verbreitet ist, in sehr großen Mengen auftreten kann und einen wesentlichen Teil des Phytoplanktons bildet (Westbroek *et al.* 1993). "Ehux" dient als Modellorganismus für molekular- und zellbiologische Untersuchungen. Die Genomgröße wird auf ca. 220 Megabasenpaare (Mbp) geschätzt. Aus einem EST (expressed sequence tag)-Projekt sind ca. 3000 ESTs etabliert (Wahlund *et al.* 2004), und seit Dezember 2004 sind die Rohdaten des Genom-Sequenzierungsprojekt des Joint Genome Institut (JGI) des Department of Energy (DOE) der USA verfügbar. Die Sequenz-Rohdaten aus diesem Projekt stehen für die BLAST-Funktion des National Center for Biotechnology Information (NCBI) zur Verfügung (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Sowohl die Sequenz des Mitochondrien- als auch des Plastidengenoms von *Emiliania huxleyi* sind bereits bekannt (Sánchez Puerta *et al.* 2004, 2005).

1.3.2 Die Diatomeen

Diatomeen gehören zur Abteilung der Heterokontophyta (= Stramenopile), zu denen auch die nicht-photosynthetischen Oomyceten wie z. B. der Erreger der Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffeln, *Phytophthora infestans*, gezählt werden. Diatomeen sind wie die Haptophyten durch die Aufnahme einer Rotalge als Endosymbiont im Zuge einer sekundären Endosymbiose entstanden. Es sind ca. 100 000 rezente, durchweg einzellige oder koloniebildende kokkale Arten bekannt (van den Hoek *et al.* 1993), die sowohl in marinen als auch in limnischen Gewässern und terrestrischen Habitaten vorkommen

1 Einleitung

(Werner 1977, Round *et al.* 1990). Diatomeen sind Hauptbestandteil des marinen Phytoplanktons und ein wichtiger Vertreter der Primärproduzenten von organisch gebundenen Kohlenstoff sowie atmosphärischem Sauerstoff; ihr Beitrag von ca. 20% zur Gesamt-Primärproduktion der Erde entspricht etwa dem derzeitigen Anteil der Regenwälder. Diatomeen haben wirtschaftliche Bedeutung als Futtermittel in Aquakulturen (Gladue und Maxey 1994) sowie als Lieferanten von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Barclay *et al.* 1994). Darüber hinaus stellen sie eine wichtige Quelle für die Entstehung von Erdöl dar, indem sie intrazelluläre Öltröpfchen einlagern, die einerseits als Energiespeicher, andererseits aber auch zur Regulation des Auftriebs im Wasser fungieren. Ebenso wie bei den Haptophyten ist der komplexe Plastid der Diatomeen von 4 Hüllmembranen umgeben und enthält Chlorophyll a und c sowie Fucoxanthin. Auch hier dient Fucoxanthin als akzessorisches Pigment und maskiert das Chlorophyll, so dass die Plastiden eine goldbraune Färbung zeigen (van den Hoek *et al.* 1993).

Der Name "Kieselalgen" geht zurück auf das von vielen Arten in der Hülle eingelagerte Siliziumdioxid (SiO_2), das in Wasser gelöst auch als "Kieselsäure" bezeichnet wird. Die Hülle setzt sich aus zwei schalenförmigen, überlappenden Hälften zusammen und ist mit artspezifischen Mustern versehen. Anhand der Schalengeometrie (Abb. 4) unterscheidet man die beiden Ordnungen der radiärsymmetrischen Centrales (z. B. *Thalassiosira pseudonana*) und der elliptischen Pennales (z. B. *Phaeodactylum tricornutum*).

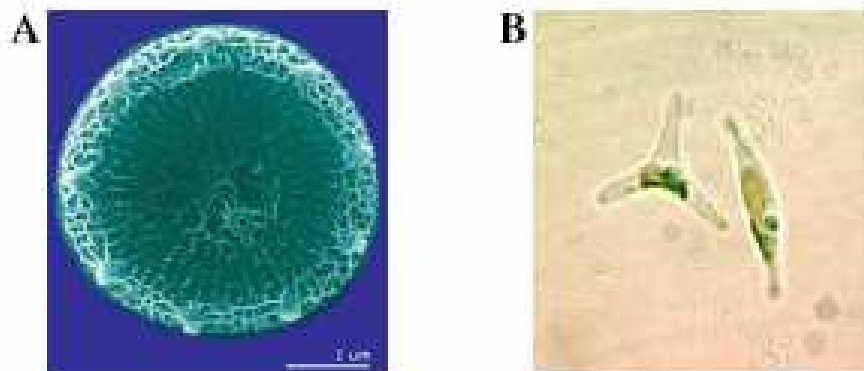


Abb. 4: *Thalassiosira pseudonana* (A) gehört zu den radiärsymmetrischen Centrales, *Phaeodactylum tricornutum* (B) zu den elliptischen Pennales. Beide Diatomeen dienen als Modellorganismen für die molekular- und zellbiologische Forschung.

<http://genome.jgi-psf.org/thaps1/thaps1.home.html>; http://www.icman.csic.es/servic/servCmicroalgas_en.htm

Thalassiosira pseudonana und *Phaeodactylum tricornutum* dienen beide als Modellorganismen für molekular- sowie zellbiologische Untersuchungen. Sie sind weltweit vertreten und haben vergleichsweise kleine Genome von ca. 34 (*T.p.*) bzw. weniger als 20 (*P.t.*) Mbp (Armbrust *et al.* 2004, Scala *et al.* 2002). *Thalassiosira pseudonana* war der

erste eukaryotische Vertreter des marinen Phytoplanktons, für den ein Genom-Sequenzierungsprojekt initiiert wurde (Armbrust *et al.* 2004). Die Rohdaten der Sequenzierung sowie bereits konkatenierte Sequenzen sind im Internet frei zugänglich (<http://genome.jgi-psf.org/thaps1/thaps1.home>). Auch das Genom von *Phaeodactylum tricornutum* wird inzwischen vollständig sequenziert, nachdem für diese Diatomee bereits ein EST-Projekt etabliert worden war (Scala *et al.* 2002, Maheswari *et al.* 2005). Die Rohdaten der Sequenzierung stehen für die BLAST-Funktion des NCBI zur Verfügung (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Für *Phaeodactylum* ist darüber hinaus ein System zur stabilen genetischen Transformation etabliert (Kap. 2.11) (Apt *et al.* 1996).

1.4 Proteintransport über Plastidenmembranen

Die Hüllmembranen der Plastiden stellen eine mechanische Barriere dar, die die meisten in der Zelle vorliegenden Verbindungen nicht ungehindert passieren können. Allerdings ist es für die Funktion der Zelle nötig, Stoffwechselprodukte zwischen Plastid und Cytoplasma auszutauschen sowie die nukleär kodierten, im Cytoplasma synthetisierten Plastiden-Proteine in dieses Kompartiment zu transportieren. Folglich hat die Zelle Mechanismen entwickelt, die den Austausch von Metaboliten zwischen Stroma und Cytosol sowie den Transport von Proteinen in den Plastiden ermöglichen. Der Austausch von Stoffwechselprodukten erfolgt über eine Reihe spezifischer, regulierter Poren, Ionenkanäle und Transporter, die sowohl in der äußeren als auch in der inneren Hüllmembran vorhanden sind (Neuhaus und Wagner 2000). Der Transport von Proteinen in den Plastiden erforderte die Etablierung von Targeting- und Import-Systemen, die die Passage durch die Plastiden-Membranen ermöglichen.

1.4.1 Proteinimport in die komplexen Plastiden der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum*

Heterokontophyta besitzen einen komplexen Plastiden mit vier Hüllmembranen, der aus einer sekundären Endosymbiose mit einer Rotalge hervorgegangen ist (Martin *et al.* 1998). Notwendig für die erfolgreiche Etablierung sekundärer Endosymbiosen war die Entwicklung von Mechanismen, die den Transport nukleär kodierter Plastiden-Proteine über die zusätzlichen Membranen hinweg ermöglichen. Diese unterscheiden sich von den Import-Systemen in Plastiden mit zwei Hüllmembranen

1 Einleitung

Die beiden inneren Hüllmembranen des *Phaeodactylum*-Plastiden entsprechen den beiden Hüllmembranen des Plastiden der endosymbiotischen Rotalge und werden als innere (IEM, inner envelope membrane) und äußere (OEM, outer envelope membrane) Hüllmembran bezeichnet. Die nach außen hin folgende periplastidäre Membran (PPM) entstammt der Plasmamembran des Endosymbionten (Cavalier-Smith 2000). Die äußere Hülle ist wahrscheinlich ein Derivat der ursprünglichen phagocytotischen Vakuole des Wirtes (Gibbs 1981, Cavalier-Smith 2000). Sie ist mit Ribosomen besetzt und mit dem ER der Zelle direkt verbunden (Bouck 1965, Ishida *et al.* 2000), weshalb sie auch als chloroplastidäres ER (CER) bezeichnet wird. Im Gegensatz zum posttranslationalen Proteinimport in die einfachen Plastiden der Plantae durch die Proteinkomplexe Toc und Tic (translocon on the outer/inner chloroplast envelope membrane) (Jarvis und Soll 2002, Gutensohn *et al.* 2006) erfolgt die Translokation der Proteine in *Phaeodactylum* kotranslational, und der erste Schritt ist der Eintritt in dieses (sekretorische) Endomembransystem der Zelle (Bhaya und Grossmann 1991). Er wird von einem ER-Signalpeptid vermittelt, das sich am N-Terminus des Proteins vor dem eigentlichen Transitpeptid befindet (Ishida *et al.* 2000, Kilian und Kroth 2003). Alle bekannten Präsequenzen für den Import von Proteinen in komplexe Plastiden zeigen eine solche bipartite Struktur aus Signal- und Transit-Peptid (Waller *et al.* 1998, Kroth und Strothmann 1999, Sulli *et al.* 1999, Wastl und Maier 2000, Archibald *et al.* 2003, Patron *et al.* 2005, Gould *et al.* 2006). Nach der Passage der äußeren Membran und somit dem Eintritt des Proteins in das Endomembransystem wird das Signalpeptid von einer Protease abgespalten (Apt *et al.* 2002), und das Transitpeptid vermittelt den gerichteten Weitertransport des Proteins in den Plastiden (Cavalier-Smith 2003). Die genauen Mechanismen, die den Transport über die inneren drei Membranen ermöglichen, sind noch nicht aufgeklärt (Kilian und Kroth 2005).

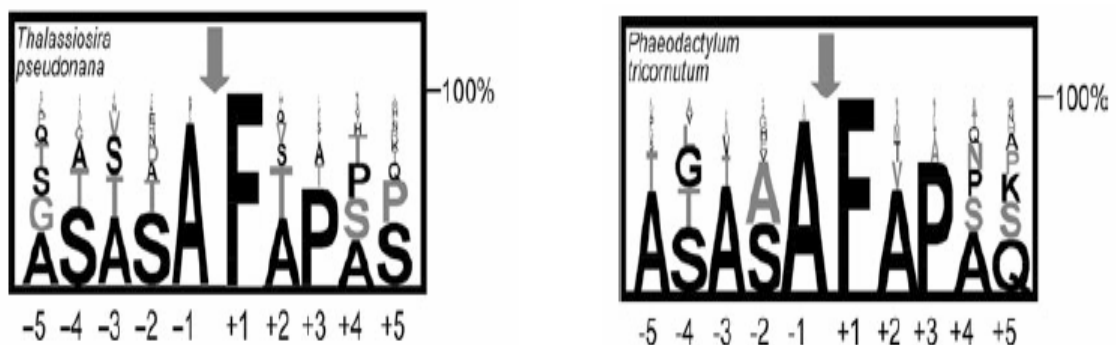


Abb. 5: Konsensus-Sequenzen innerhalb der bipartiten Signal-Transit-Peptide der Diatomeen *Thalassiosira pseudonana* und *Phaeodactylum tricornutum*. Abszisse: Position der jeweiligen AS relativ zur Spaltstelle des Signalpeptides. Ordinate: relative Häufigkeit der jeweiligen AS. Verändert aus Kilian und Kroth (2005).

Die bipartiten Präsequenzen der Plastiden-Proteine von *Phaeodactylum tricornutum* und *Thalassiosira pseudonana* enthalten ein konserviertes Aminosäure-Sequenzmotiv an der Protease-Spaltstelle des Signalpeptides (Kroth 2002, Kilian und Kroth 2005). Dieses ASAF- oder AFAP-Motiv (Abb. 5) ist hochkonserviert, und die Protease-Schnittstelle für die Abspaltung der Signalpeptide befindet sich in allen Protein-Vorläufern unmittelbar vor dem Phenylalanin (F). Reportergenkonstrukte, die ausschließlich aus Signalpeptiden (inklusive des ASAF-/AFAP-Motivs, jedoch ohne das Transitpeptid) und dem Green Fluorescent Protein (GFP) bestehen, zeigen in *Phaeodactylum* eine Anreicherung des GFP in charakteristischen Strukturen ("blob"-like structures, BLS) innerhalb der Plastidenhülle, wahrscheinlich an einer der inneren Membranen (Kap. 3.6) (Kilian und Kroth 2005), da das für den Transport durch die inneren Membranen nötige Transitpeptid fehlt.

1.5 Die Glucose-6-Phosphat Isomerase als wirtszell-spezifischer Marker der Evolution

Die im Cytosol lokalisierte Glucose-6-phosphat Isomerase (GPI, EC 5.3.1.9) erfüllt essentielle Funktionen in der katabolischen Glykolyse sowie in der anabolischen Gluconeogenese. Sie katalysiert die reversible Isomerisierung von Glucose-6-phosphat (G6P) und Fructose-6-phosphat (F6P) (Abb. 6) und ist in Eukaryoten, Bakterien und Archaeen ubiquitär verbreitet.

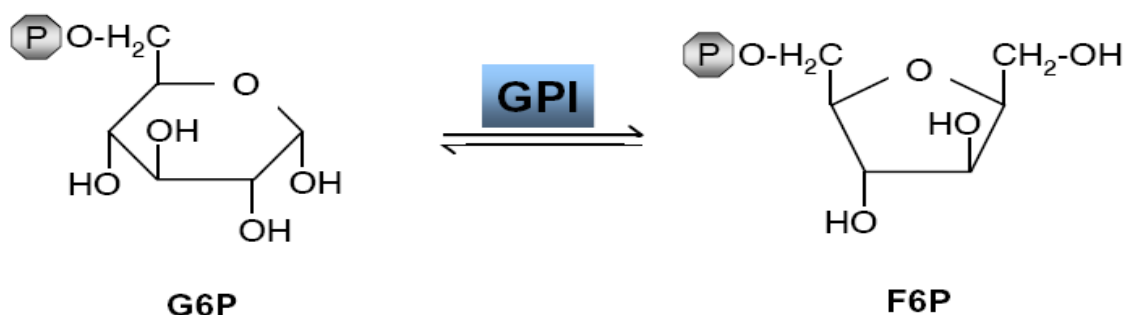


Abb. 6: Reversible Isomerisierung von Glucose-6-Phosphat (**G6P**) und Fructose-6-Phosphat (**F6P**) durch die Glucose-6-Phosphat Isomerase (**GPI**) in Glykolyse und Gluconeogenese.

Höhere Pflanzen besitzen neben der cytosolischen GPI auch ein plastidär lokalisiertes Enzym cyanobakteriellen Ursprungs (Nowitzki *et al.* 1998), dessen Aminosäure-Sequenz nur eine Homologie von etwa 30% mit der cytosolischen Form aufweist. Diese GPI ist

innerhalb der Chloroplasten essentiell sowohl für die Stärkesynthese (Yu *et al.* 2000) als auch für den oxidativen Pentosephosphatweg (Martin und Herrmann 1998).

Die Glykolyse war bereits vor der Entstehung der Plastiden in den heterotrophen Eukaryoten etabliert (Margulis 1970, Doolittle 1998). Sie ist charakteristisch für alle Eukaryoten. Die an diesem Stoffwechselweg beteiligten Enzyme sollten die Wirtszellen der Endosymbiosen repräsentieren und phylogenetische Analysen der GPI zur Aufklärung der Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Wirtszellen der verschiedenen Algengruppen beitragen.

1.6 Biosynthese von Isopentenyl Pyrophosphat (IPP)

"Isopren" (2-Methyl-1,3-butadien) findet sich formal als Grundeinheit in der chemischen Struktur einer Vielzahl von Naturstoffen, die daher auch als "Isoprenoide" (Terpene) bezeichnet werden. Diese Stoffklasse umfasst eine große Vielfalt von mehr als 22.000 sehr heterogenen Verbindungen (Connolly und Hill 1992), von denen der Großteil in Pflanzen, ein geringerer Anteil in tierischen Organismen gebildet wird. Zu ihnen gehören u. a. die Steroide (wie z. B. Brassinosteroide in pflanzlichen, Cholesterol in tierischen Organismen), Ubi- und Plastochinone, die Carotinoide und das Phytol in den Seitenketten der Chlorophylle. Das tatsächliche Vorläufermolekül in der Biosynthese der Isoprenoide ist allerdings nicht Isopren, sondern seine biochemisch aktivierte Form, das Isopentenyl Pyrophosphat (IPP), sowie dessen Isomer Dimethylallyl Pyrophosphat (DMAPP).

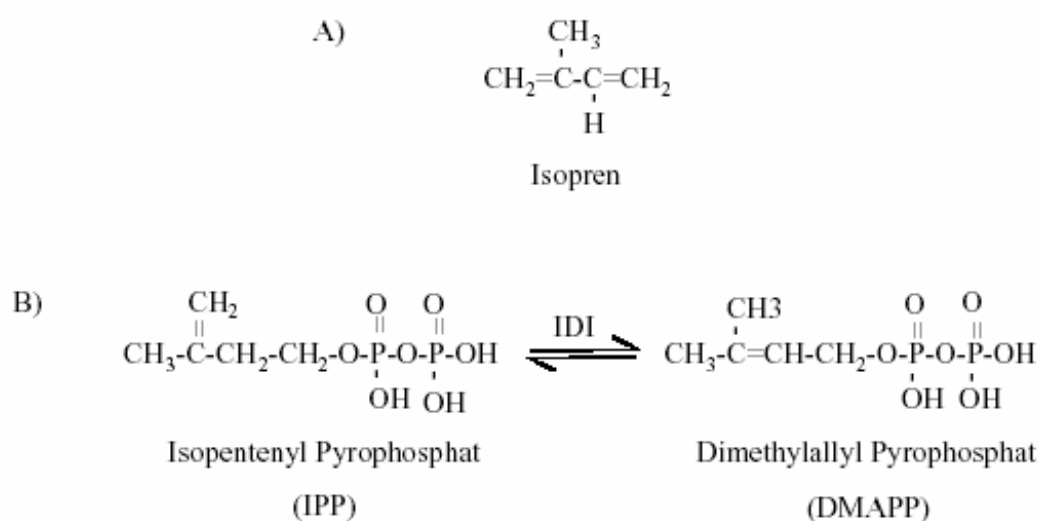


Abb. 7: **A)** "Isopren" ist formal die chemische Grundeinheit der Terpene ("Isoprenoide). **B)** Isopentenyl Pyrophosphat (IPP) und Dimethylallyl Pyrophosphat (DMAPP) als Vorläufermoleküle des Isopren werden durch die Isopentenyl Pyrophosphat Isomerase (IDI) reversibel ineinander umgewandelt

IPP und DMAPP werden von einer Isopentenyl Pyrophosphat Isomerase (= Isopentenyl Diphosphat Isomerase, IDI) ineinander überführt (Abb. 7); die Bildung der Terpene erfolgt durch Kondensation von IPP und DMAPP. Dieser Schritt dient ubiquitär in allen drei Reichen (Archaea, Eubakterien und Eukaryoten) der Bildung von Isopren. Die Biosynthese des IPP selbst jedoch kann über zwei völlig unterschiedliche Stoffwechselwege erfolgen (Rohmer *et al.* 1993, 1996, Lichtenthaler *et al.* 1997a, Kuzuyama 2002), deren Verbreitung innerhalb der verschiedenen Organismengruppen unterschiedlich ist (Lange *et al.* 2000). In höheren Pflanzen existieren beide Wege, sie zeigen jedoch ein kompartimentspezifisches Vorkommen: während sich der Mevalonat (MVA)-Pathway im Cytosol befindet, wird IPP im Plastiden über den Methylerythritol-phosphat (MEP)-Pathway gebildet (Abb. 8). Das in den verschiedenen Kompartimenten synthetisierte IPP fließt auch jeweils in die Herstellung kompartiment-spezifischer Isoprenoid-Verbindungen ein (Eisenreich *et al.* 1998, 2001, Lange und Ghassemian 2003).

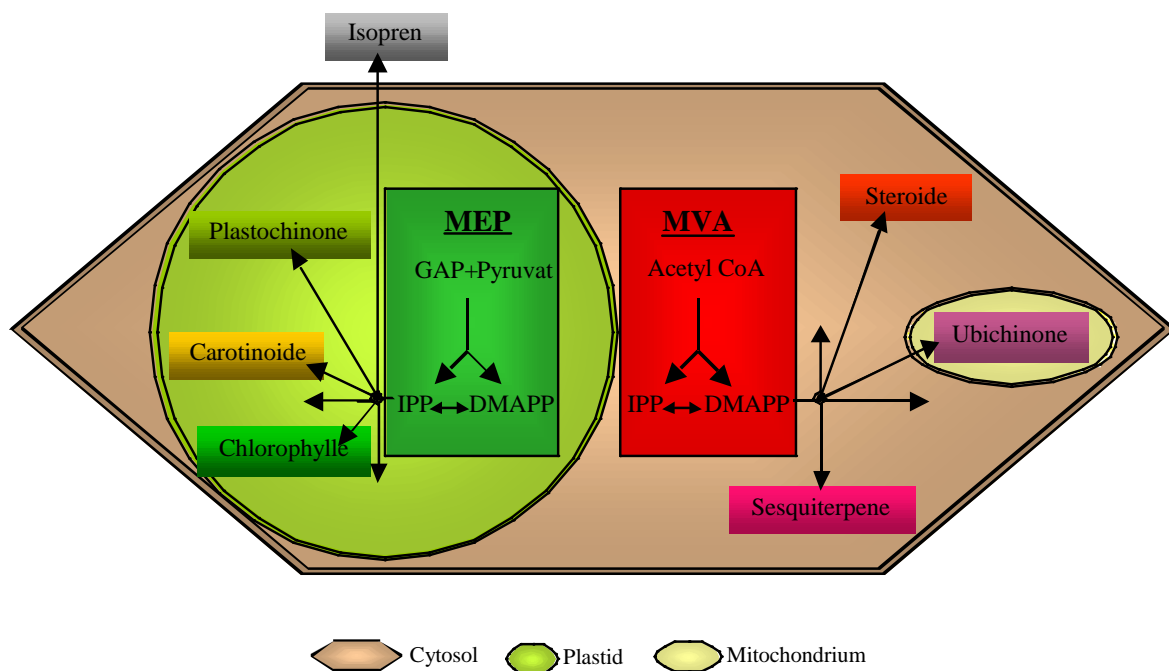


Abb. 8: Kompartimentierung der IPP-Biosynthese in den Zellen Höherer Pflanzen (siehe Text). **MEP**: Methylerythritol Phosphat. **MVA**: mevalonic acid. **GAP**: Glycerinaldehyd-3-Phosphat. **IPP**: Isopentenyl Pyrophosphat **DMAPP**: Dimethylallyl Pyrophosphat.

1.6.1 Der Mevalonat (MVA)-Weg der IPP-Biosynthese

Der Mevalonat- oder MVA-Pathway (MVA = mevalonic acid, Mevalonsäure) der IPP-Biosynthese wurde erstmals in isolierten Leberzellen sowie in *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt und in den 1960er Jahren von Konrad Bloch und Feodor Lynen aufgeklärt

1 Einleitung

(Katsuki und Bloch 1967, Lynen 1967), denen 1964 der Nobelpreis für Medizin verliehen wurde. Er ist der einzige Biosyntheseweg für IPP in tierischen und pilzlichen Zellen. Auch in gram-positiven Eubakterien und den meisten Archaeen konnte er nachgewiesen werden und galt daher lange als der universelle Stoffwechselweg zur Herstellung von IPP (Popják 1958, Spurgeon und Porter 1981, Lichtenthaler *et al.* 1997a). In höheren Pflanzen wird das über den MVA-Weg im Cytosol gebildete IPP für die Synthese von Sterolen und bestimmten Sesquiterpenen (Nes und Venkatramesh 1999) sowie für den Einbau in die Ubichinon-Seitenketten (Disch *et al.* 1998a) in den Mitochondrien verwendet.

Das Ausgangsprodukt für die Synthese von IPP über den MVA-Pathway ist Acetoacetyl-CoA. Aus der Kondensation mit Acetyl-CoA entsteht HMG-CoA (Hydroxymethylglutaryl-CoA), was über das namensgebende Mevalonat zu IPP umgewandelt wird. Abbildung 9 zeigt schematisch die verschiedenen Reaktionen, die daran beteiligten Enzyme und die gebildeten Zwischenprodukte. Die vollständigen Bezeichnungen der Enzyme sowie ihre EC (Enzyme Commission) Nummern sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab.1: Am MVA-Pathway beteiligte Enzyme mit verwendeten Abkürzungen, EC Nummern und Acc. Nr. der jeweiligen Referenz-Sequenz aus *Arabidopsis thaliana* (**A.t.**)

Vollständiger Name	Abkürzung	EC	Acc. A.t.
3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A Synthase	HMGS	2.3.3.10	CAA58763
3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A Reductase	HMGR	1.1.1.88	P14891
Mevalonat Kinase	MK	2.7.1.36	CAA54820
5-Phosphomevalonat Kinase	PMK	2.7.4.2	NP_174473
Mevalonat 5-diphosphat Decarboxylase	MDD	4.1.1.33	NP_181404

Der MVA-Pathway ist der Angriffspunkt für die so genannten "Statine" wie z. B. Atorvastatin, die in der Medizin zur Senkung erhöhter Blutfettwerte eingesetzt werden ("Cholesterin-Blocker"). Sie inhibieren effektiv durch eine kompetitive Hemmung das Enzym HMGR (Hydroxymethylglutaryl-CoA Reductase) (Istvan und Deisenhofer 2001) und führen somit im menschlichen Körper zu einem stark herabgesetzten IPP-Spiegel und folglich auch an daraus synthetisiertem Cholesterol. Die Hemmung der IPP-Synthese hat beträchtliche negative Auswirkungen auf die Zellfunktion, weshalb u. a. das von der Bayer AG seit 1997 unter dem Namen Lipobay® vertriebene Cerivastatin trotz großen wirtschaftlichen Erfolgs aufgrund der massiven Nebenwirkungen und einigen Todesfällen 2001 wieder vom Markt genommen wurde. In höheren Pflanzen führt die Hemmung der HMGR durch z. B. Lovastatin zu einer verminderten Zellteilungsaktivität (Miyazawa *et al.* 2002) und geringerem Zellwachstum (Suzuki *et al.* 2003).

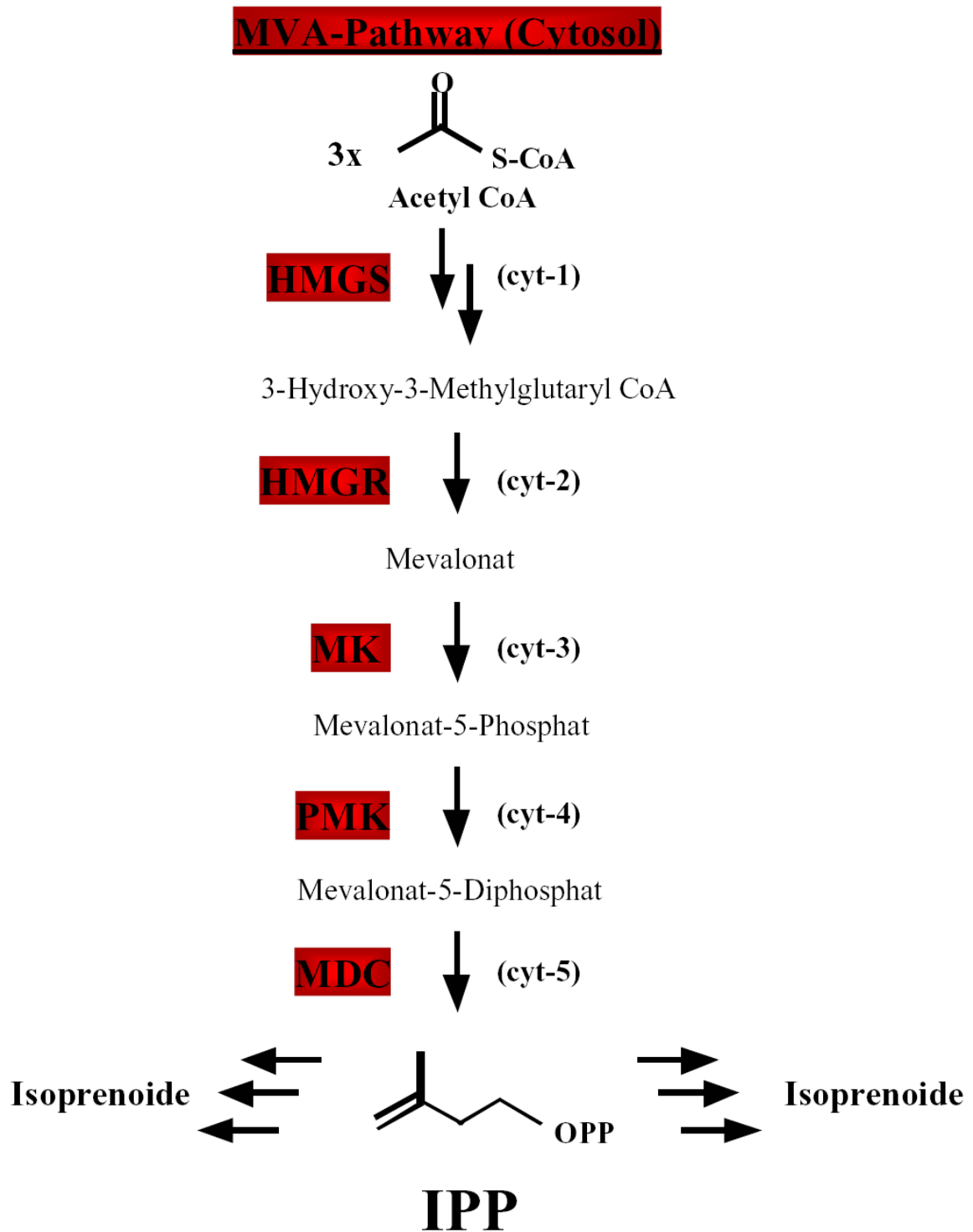


Abb. 9: Cytosolischer Mevalonat (MVA)-Pathway der IPP-Biosynthese. Die an der jeweiligen Reaktion beteiligten Enzyme sind rot unterlegt. **MVA:** mevalonic acid. **IPP:** Isopentenyl Pyrophosphat. **cyt-:** Nummer des jeweiligen Enzyms innerhalb des Pathways. Bezeichnung der Enzyme siehe Tabelle 1.

1.6.2 Der Methylerythritol Phosphat (MEP)-Weg der IPP-Biosynthese

Der zweite Stoffwechselweg zur Biosynthese von IPP wird nach dem Zwischenprodukt 2-C-Methyl-D-erythritol 4-phosphat (MEP) heute allgemein als MEP-Pathway oder auch als Mevalonat-unabhängiger Pathway bezeichnet.

Er ist erst seit 13 Jahren bekannt und wurde von Michel Rohmer und seinen Mitarbeitern in *E. coli* entdeckt (1993). Der MEP-Pathway ist in den meisten Eubakterien der einzige Biosyntheseweg für IPP (Eisenreich *et al.* 1998, Lange *et al.* 2000); in Eukaryoten ist er in den Plastiden lokalisiert. In höheren Pflanzen wird das über diesen Weg gebildete IPP für die Biosynthese von plastidenspezifischen Isoprenoidverbindungen wie z. B. den Carotinoiden und den Seitenketten der Chlorophylle und Plastochinone verwendet, aber auch für die Herstellung des von Pflanzen emittierten Isopren selbst (Abb. 8) (Zeidler *et al.* 1997, Loreto *et al.* 2004). Eine schematische Darstellung der sieben Reaktionsschritte, der daran beteiligten Enzyme und der gebildeten Zwischenprodukte findet sich in Abbildung 10.

Obwohl dieser Stoffwechselweg erst unlängst entdeckt wurde, sind die daran beteiligten Enzyme und die entstehenden Zwischenprodukte bereits vollständig entschlüsselt (zusammengefasst in Rodríguez-Concepción und Boronat 2002, Eisenreich *et al.* 2004). Der MEP-Pathway unterscheidet sich grundlegend vom MVA-Pathway sowohl in den genutzten Ausgangsverbindungen als auch in seinen Intermediaten. Als Substrate für die Synthese von IPP dienen hier Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) und Pyruvat, die durch Kondensation zu Deoxyxylulose-Phosphat (DXP) umgewandelt werden. Über das namensgebende MEP wird letztlich IPP gebildet. Die vollständigen Bezeichnungen der Enzyme sowie ihre EC Nummern sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 2: Am MEP-Pathway beteiligte Enzyme mit verwendeten Abkürzungen, EC Nummern und Acc. Nr. der jeweiligen Referenz-Sequenz aus *Arabidopsis thaliana* (**A.t.**)

Vollständiger Name	Abkürzung	EC	Acc. A.t.
1-Deoxy-D-Xylulose 5-phosphat Synthase	DXS	2.2.1.7	NP_193291
1-Deoxy-D-Xylulose 5-phosphat Reductoisomerase	DXR	1.1.1.267	NP_201085
2-C-Methyl-D-erythritol 4-phosphat Cytidyltransferase	MCT	2.7.7.60	BAB21592
4-(Cytidin 5-diphospho)-2-C-Methyl-D-erythritol Kinase	CMK	2.7.1.148	AAG01340
2-C-Methyl-D-Erythritol 2,4-CyclodiPhosphate Synthase	MECPS	4.6.1.12	NP_850971
4-Hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl Diphosphate Synthase	HDS	1.17.4.3	NP_200868
4-Hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl Diphosphate Reductase	HDR	1.17.1.2	AAN87171

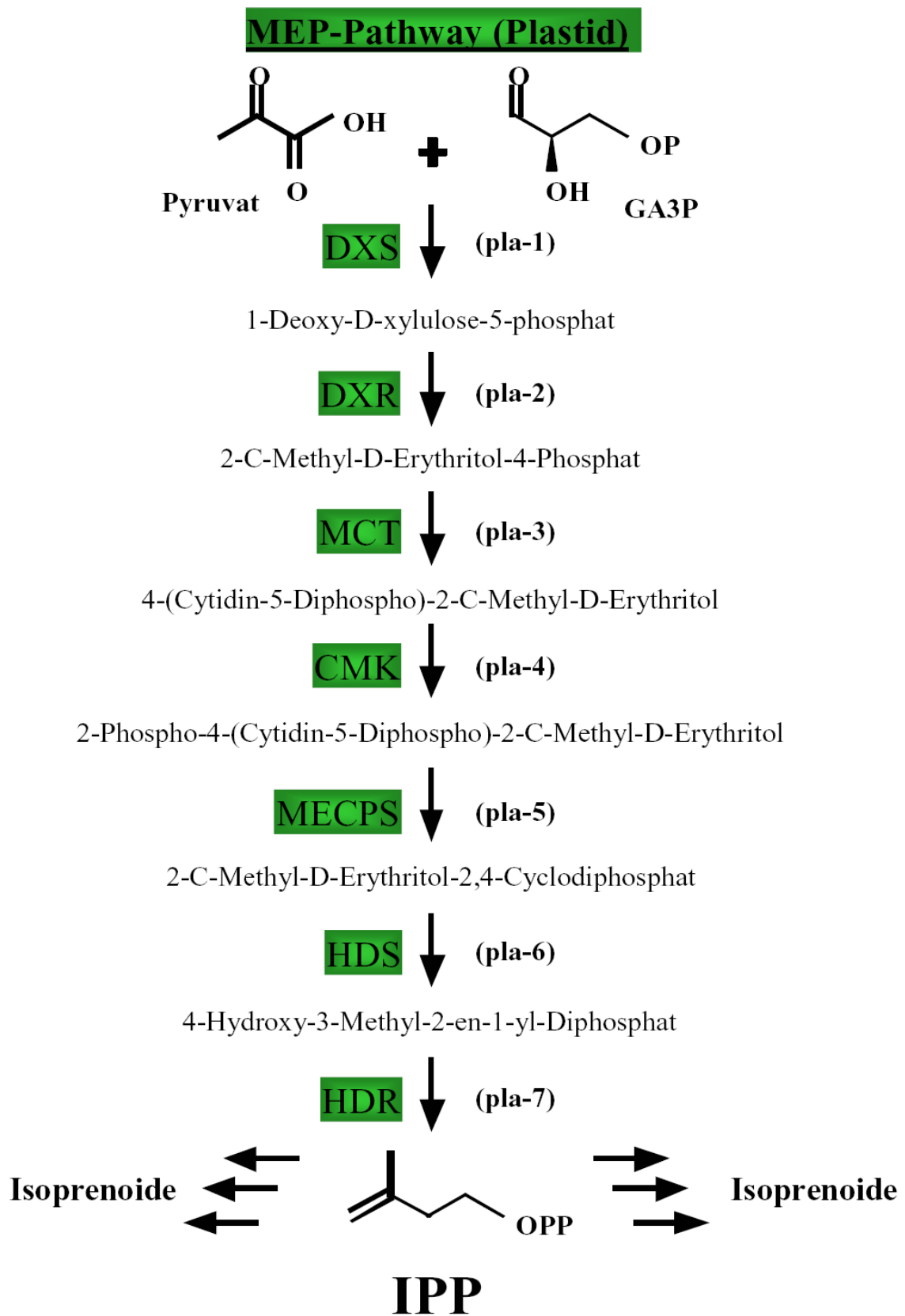


Abb. 10: Plastidärer MEP-Pathway der IPP-Biosynthese. Die an der jeweiligen Reaktion beteiligten Enzyme sind grün unterlegt. **MEP:** Methylerythritol-phosphat. **IPP:** Isopentenyl Pyrophosphat. **pla-:** Nummer des jeweiligen Enzyms innerhalb des Pathways. Bezeichnungen der Enzyme siehe Tabelle 2.

Der MEP-Pathway ist ein vielversprechender Ansatzpunkt für den therapeutischen Einsatz von Antibiotika, da er in den meisten Eubakterien, nicht aber im Menschen vorhanden ist. Der bekannteste Inhibitor des MEP-Wegs ist Fosmidomycin, welches das Enzym DXR (Deoxyxylulose-Phosphat Reductoisomerase, *pld-2*) hemmt und in den frühen 1980er Jahren als Antibiotikum gegen gram-negative Bakterien entwickelt wurde (Kojo *et al.* 1980, Mine *et al.* 1980). Hassan Jomaa und seine Mitarbeiter konnten dann Ende der 1990er Jahre nachweisen, dass auch der Erreger der Malaria tropica, *Plasmodium falciparum*, Isoprenoide über den MEP-Pathway im Apicoplasten synthetisiert und sehr sensitiv auf die Behandlung mit Fosmidomycin reagiert (Jomaa *et al.* 1999). Im Rahmen klinischer Teststudien werden Fosmidomycin und Derivate desselben bereits erfolgreich in der Malaria-Therapie eingesetzt (Wiesner *et al.* 2003, Borrmann *et al.* 2005).

1.6.3 Verbreitung von MVA- und MEP-Pathway

Die Existenz des MEP-Wegs ist heute in der Mehrzahl der gram-negativen Eubakterien (Rohmer *et al.* 1993, Cornish *et al.* 2006) und in den Cyanobakterien (Disch *et al.* 1998b) nachgewiesen. Im Gegensatz dazu synthetisieren gram-positive Eubakterien (Wilding *et al.* 2000) und Archaea (Boucher *et al.* 2004, Grochowski *et al.* 2006) IPP über den MVA-Weg.

Innerhalb der Eukaryoten konnte der MEP-Weg ausschließlich in Plastiden nachgewiesen werden. Aplastidäre Organismen wie Tiere und Pilze synthetisieren IPP ausschließlich über den cytosolischen MVA-Weg. Höhere Pflanzen nutzen beide Stoffwechselwege, wobei der MVA-Weg im Cytosol und der MEP-Weg im Plastiden lokalisiert ist (Eisenreich *et al.* 2004).

Die allgemeine Verbreitung von MEP- und MVA-Weg innerhalb der Plantae (Streptophyta/Chlorophyta, Rhodophyta und Glaucophyta), deren gemeinsamer Ursprung auf eine einzige primäre Endosymbiose mit einem Cyanobakterium zurückzuführen ist (Rodríguez-Ezpeleta *et al.* 2005), wurde bisher nicht analysiert. Biochemische Untersuchungen mit radioaktiv markierten Substraten geben Hinweise darauf, dass auch die Charophyceen (Streptophyta) als höchstentwickelte Gruppe innerhalb der Grünalgen beide Stoffwechselwege besitzen, wohingegen die Chlorophyta (z. B. *Chlamydomonas*) sämtliche Isoprenoide über den MEP-Weg synthetisieren und anscheinend nicht über den MVA-Weg verfügen (Schwender *et al.* 2001). Diese Beobachtung wird dadurch bestätigt, dass sich im inzwischen vollständig sequenzierten Kerngenom der Chlorophycee *Chlamydomonas reinhardtii* (Shrager *et al.* 2003) keine Gene für Enzyme des MVA-Wegs

1 Einleitung

finden lassen. Es ist bisher nicht bekannt, ob die einzellige Grünalge *Mesostigma viride* über beide Wege der IPP-Biosynthese verfügt. Die Klassifikation dieser Alge war lange Zeit höchst umstritten (zusammengefasst in McCourt *et al.* 2004). Inzwischen wird *Mesostigma* aufgrund zahlreicher molekularer Belege den Streptophyten zugeordnet und als ein Schlüsselorganismus in der Evolution der Landpflanzen betrachtet (Simon *et al.* 2006, Petersen *et al.* 2006b, Rodríguez-Ezpeleta *et al.* 2006).

Die Verbreitung der beiden Synthesewege innerhalb der Rotalgen wurde bisher nicht untersucht. Biochemische Studien deuten auf die Existenz beider Wege in *Cyanidium caldarium* hin (Disch *et al.* 1998b), wohingegen im Genom von *Cyanidioschyzon merolae* (Matsuzaki *et al.* 2004) bis auf ein Homolog der HMGS keine Gene für Enzyme des MVA-Pathways vorhanden sind.

Auch die Verbreitung von MVA- und MEP-Weg in den verschiedenen Gruppen der komplexen Algen ist bisher unbekannt. Markierungsexperimente mit verschiedenen Vertretern der Stramenopilen deuten auf die Existenz beider Stoffwechselwege in Crysohyceen (Disch *et al.* 1998b) und auch in Diatomeen (Cvejic und Rohmer 2000, Massé *et al.* 2004a, b) hin. Der Malariaerreger *Plasmodium falciparum* bildet IPP nur über den im Apicoplasten lokalisierten MEP-Weg (Jomaa *et al.* 1999), analog zu den Chlorophyten fehlen auch hier die Gene für die Enzyme des cytosolischen MVA-Wegs. Die Verbreitung der beiden IPP-Biosynthesewege innerhalb der restlichen Gruppen der komplexen Algen mit rotem Plastiden (der Haptophyta, Cryptophyta und Dinophyta) ist bisher gänzlich ungeklärt. Ebenso ist nicht bekannt, wie die Ciliaten und *Perkinsus* IPP synthetisieren. Sie werden zusammen mit den Apicomplexa und den Dinophyta als Alveolata klassifiziert (Gajadhar *et al.* 1991, Budin und Philippe 1998), wobei in den Ciliaten bisher keinerlei Hinweise auf die Existenz eines Plastiden gefunden wurden (Eisen *et al.* 2006).

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit umfasst zwei Themenschwerpunkte. Zum einen wird die Verbreitung der cytosolischen und der plastidären Isoform der Glucose-6-phosphat Isomerase (GPI) in den verschiedenen Vertretern der Plantae (Streptophyta/Chlorophyta, Rhodophyta und Glaucophyta), der Alveolata (Dinophyta, Apicomplexa, Perkinsea und Ciliata) und der "Chromista" (Haptophyta, Stramenopile und Cryptophyta) phylogenetisch analysiert. Die Evolution dieses Gens im Verlauf der primären und sekundären Endosymbiosen soll untersucht, und die Verwandtschaftsbeziehungen der verschiedenen Abteilungen sollen insbesondere anhand des cytosolischen Gens, einem spezifischen Marker der Wirtszelle, charakterisiert werden.

Der Schwerpunkt dieser Dissertation ist die molekulare Analyse der Isoprenoid (IPP)-Biosynthesewege in den oben genannten eukaryotischen Abteilungen. Ziel der Arbeit ist die Etablierung umfangreicher Sequenzdatensätze für alle fünf Enzyme des cytosolischen MVA- ("cyt-1" bis "cyt-5") sowie der sieben Enzyme des plastidären MEP-Pathways ("pla-1" bis "pla-7") und deren phylogenetische Analyse. Erst seit etwa zehn Jahren ist bekannt, dass Pflanzen über beide Stoffwechselwege verfügen. Obwohl deren Präsenz in Grünalgen bisher noch nicht molekular untersucht wurde, belegt die Genomanalyse von *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta) das Fehlen des cytosolischen MVA-Pathways. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Verteilung in der Grünalge *Mesostigma viride*, einem Schlüsselorganismus der Evolution von Charophyceen und Landpflanzen (Streptophyta), umfassend charakterisiert. Die transformierbare Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* dient als Modellorganismus zur Untersuchung der Zellbiologie komplexer Algen. Durch Transformation mit eGFP-Reportergen-Konstrukten soll untersucht werden, ob die subzelluläre Lokalisation beider Wege zur Isoprenoid-Biosynthese nach der sekundären Endosymbiose erhalten blieb. Die Verteilung der beiden Stoffwechselwege ist in den verschiedenen Abteilungen der "Chromista" und der Alveolata bisher unbekannt und wird im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Besondere Bedeutung haben die entsprechenden IPP-Gene im Zusammenhang mit dem in jüngster Zeit kontrovers diskutierten Ursprung komplexer Algen durch sekundäre und tertiäre Endosymbiosen. Insbesondere die phylogenetischen Beziehungen der Haptophyten zu den Stramenopilen und Cryptophyten sollen in diesem Kontext untersucht werden, um die angebliche Monophylie der "Chromista" kritisch zu hinterfragen. Hinsichtlich der Alveolata können durch die Verteilung der beiden IPP-Biosynthesewege mindestens zwei offene Fragen der Evolution untersucht werden. Einerseits ist trotz der kompletten Sequenzierung des Malaria-Erregers immer noch offen, ob sich der heterotrophe Plastid der Apicomplexa auf eine Rotalge zurückführen lässt. Andererseits ist der plastidäre MEP-Pathway ein ideales Testsystem zur genaueren Untersuchung jüngster Hinweise auf die Präsenz eines bisher unbekannten Plastiden in Perkinsea, die eine evolutive Schlüsselstellung innerhalb des Superensembles Alveolata haben.

1 Einleitung

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Im Rahmen dieser Arbeit kamen folgende Geräte zum Einsatz:

Autoklav	Westima-Sauter Sterilisator 4.4.6 S1
Computersysteme	Apple Macintosh PowerPC G4, Mac OS D1-9.2.2 Apple Macintosh iBook G3, Mac OS X-10.3.9 Sony Vaio, Windows XP Professional
Computersoftware	Microsoft Office MacMolly (Mologen) Oligo Analyzer EditView 1.0.1 Phylip Package (Felsenstein) Treefinder (Jobb <i>et al.</i> 2004) CLUSTAL_X Version 1.81 (Thompson <i>et al.</i> 1997) Canvas 6 (ACD) TreeViewPPC 1.5.3 Adobe Photoshop 5.0, Acrobat Reader 6.0
Destillatoren	Heraeus Destamat
Eismaschine	Ziegra
Elektrophorese-Gelkammern	BioRad
Elektrophorese-Netzgeräte	Ingenieurbüro Fischer
Elektroporator	BioRad Gene Pulser II mit Pulse Controller II
Fluoreszenzphotometer	Pharmacia LKB Novaspec II
Folienschweißgerät	Krupps Vacupack 2 Plus
Geiger-Müller-Zähler	Berthold LB1200, Berthold LB1210 B
Geldokumentationsanlage	BioRad mit Quantity One Version 4.5.2
Kaffeemaschine	Bosch
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr
- Ultratiefkühltruhe	GFL
Magnetrührer	IKAMAG Reo
Mikroskope	
- Lichtmikroskop	Zeiss
- Fluoreszenz	Zeiss Axiophot
- Konfokales inverses	

2 Material und Methoden

Laserscanning Mikroskop	Zeiss Axiovert LSM 510
Mikrowellenherd	Siemens
Partikel-Kanone	BioRad Biolistic-PDS-1000/He Particle Delivery System mit Wolframpartikeln: M10: Kat.-Nr. 165-2266 M17: Kat.-Nr. 165-2267 mit Berstscheiben: 650, 900, 1100, 1350 psi (Kat.-Nr. 165-2327 – 165-2330)
pH-Meter	Schott CG 840
Pipetten	Gilson P2, P20, P200, P1000
Schüttler	IKA Vibrax VXR
Schüttelplattform	GFL 3015
Spektralphotometer	Amersham Pharmacia Biotech Ultrospec 2000 Shimadzu UV-120-02
Spülmaschine	Newamatic 60
Sterilbank	Heraeus LaminAir HLB 2472
Waagen	Sartorius
Wasserbäder	GFL
- Kühlwasserbad	Julabo F 10-Kryostat
Thermocycler	Eppendorf Mastercycler Gradient
Thermostat	Eppendorf 5320
Transilluminator	Bachofer IL-350-M
Zentrifugen	
- Kühlzentrifuge	Sorvall RC-5B mit Rotoren GS-3, SS34
- Tischzentrifugen	Heraeus Biofuge 22R Heraeus Biofuge fresco
- Ultrazentrifuge	Beckmann TL100.2 mit Rotoren Ti 70, TLA 100.2
- Untertischzentrifuge	Beckmann GPKR

2.2 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Enzyme

Es wurden Verbrauchsmaterialien und Chemikalien der Firmen Amersham Bioscience, Applichem, BD Biosciences, Bioline, Diagonal, Fluka, Invitrogen, Merck, Pall, Roth, Sarstedt, Serva und Sigma verwendet.

Restriktionsenzyme und weitere DNA-modifizierende Enzyme wurden von den Firmen Fermentas, Invitrogen, Q•BIOgene und Roche bezogen.

Radiochemikalien wurden von Hartmann Analytik (Braunschweig) geliefert. Röntgenfilme (Hyperfilm™ MP) stammen von Amersham Biosciences, Entwickler- und Fixierlösung von der Firma Kodak.

Oligonukleotid-Primer wurden von den Firmen MWG Biotech und Invitrogen synthetisiert. Verbrauchsmaterialien für die Transformation von *P. tricornutum* wurden von der Firma BioRad bezogen.

2.3 Kommerzielle Reagenzsätze (Kits)

Die in Tabelle 3 aufgeführten Kits wurden verwendet:

Tab. 3: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Reagenzsätze (Kits)

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Katalog Nummer</u>
Oligotex™ mRNA Mini Kit	Qiagen	70022
GeneClean® Turbo Kit	Q•BIOgene	1102-600
GeneRacer™ Kit	Invitrogen	L1502-01
QIAamp Tissue Kit	Qiagen	29304
TA Cloning® Kit	Invitrogen	K2020-20, K2020-40
ThermoScript™ RT-PCR System	Invitrogen	11146-024

2.4 Arbeiten mit *E. coli*

Die Anzucht von *Escherichia coli* auf Festmedium und in Flüssigmedien, die Transfektion mit λ -DNA sowie die Transformation chemisch (CaCl_2) oder elektrokompeter *E. coli* Zellen mit Plasmid-DNA erfolgten nach Standard-Protokollen (Sambrook *et al.* 1989). Zur Anzucht von *E. coli* Kulturen wurden CY-Medium, dYT-Medium, LB-Medium und SOC-Medium verwendet. Folgende Stämme wurden eingesetzt: XL1-Blue MRF' (Stratagene), SOLR (Stratagene), XL0LR (Stratagene), KW251 (Promega # T3571).

2.5 Plasmid- und Bakteriophagen-Vektoren

Folgende Plasmid- und Phagen-Vektoren kamen zum Einsatz: pBlueskript II SK+ und KS+ (Stratagene), pCR®2.1 (Invitrogen), pPha-T1 (Zaslavskaja *et al.* 2000; Kap. 2.11.2), λZAPII und λZAP Express (Stratagene), λNM1149 (Murray 1983), λEMBL3 (Stratagene).

2.6 In dieser Arbeit verwendetes Algen-Zellmaterial

2.6.1 Herkunft des Algenmaterials

Die folgenden Algenspezies wurden von der Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen (SAG) erworben und anschließend im Labor kultiviert: Glaucophyta: *Cyanophora paradoxa* SAG 29.60. Haptophyta: *Emiliania huxleyi* SAG 33.90, *Pavlova lutheri* SAG 926-1, *Prymnesium parvum* SAG 127.79.

Zellen der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin (UTEX 646) wurden freundlicherweise von Carolina Río Bártulos, TU Braunschweig, zur weiteren Kultur und Transformation zur Verfügung gestellt.

Pflanzenmaterial der Grünalge *Chara vulgaris* wurde von Jörn Petersen, TU Braunschweig, im Freiland gesammelt (Petersen *et al.* 2003), gereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

2.6.2 Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Algenspezies

Die Kultivierung der von der SAG erworbenen Algenspezies (Kap. 2.6.1) erfolgte jeweils im von der Sammlung empfohlenen Medium (*C. paradoxa*: „V+“, *E. huxleyi*: „SWES“, *P. lutheri* und *P. parvum*: 1/2 „SWES“). *C. paradoxa* wurde in 3 l Erlenmeyerkolben in einem Volumen von 1,5 l Medium in einem 16h/8h Hell/Dunkel-Rhythmus mit einer Beleuchtungsstärke von 75-100 µE kultiviert. Die verschiedenen Haptophyten-Spezies wurden in 10 l Kultivierungsgefäßen in einem Volumen von 8 l Medium mit einer Beleuchtungsstärke von 75-100 µE unter ständiger steriler Belüftung mit 1,5% CO₂ angezogen. Zur Verarbeitung wurden die Kulturen in Falcon™-Gefäße überführt und das Zellmaterial durch Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge vom Medium befreit. Die pelletierten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80° C aufbewahrt.

P. tricornutum Wildtyp-Zellen wurden in 200 ml f/2-Medium (Guillard und Ryther 1962) unter ständigem Schütteln mit 60 rpm in einem 16h/8h Hell/Dunkel-Rhythmus inkubiert. Die Kultivierung transformierter *P. tricornutum* Zellen erfolgte auf Festmedium (f/2 mit 8% Agarose) bzw. in Flüssigkultur (f/2) in Dauerbeleuchtung mit 75-100 μE .

2.7 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.7.1 Standard-Methoden beim Arbeiten mit DNA

Standard-Methoden beim Arbeiten mit DNA erfolgten entsprechend der Standardprotokolle nach Sambrook *et al.* (1989). Im Zuge dieser Arbeit wurden folgende Standard-Methoden angewendet:

Methoden zur Isolierung von DNA: Plasmid-Minipräparationen aus *E. coli* Zellen, λ -Bakteriophagen-Minipräparationen.

Methoden zur Reinigung von DNA: Phenolisierung, Ethanol- oder Isopropanolpräzipitation, Agarose-Gelelektrophorese, Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren, Sephadex-G-50-Chromatographie

Enzymatische Modifikation von DNA: Restriktionsspaltungen, Ligation mit T₄-DNA-Ligase, Dephosphorylierung von DNA mit Alkalischer Phosphatase, Phosphorylierung von DNA mit T₄-Kinase, Auffüllreaktion mit Klenow-Polymerase.

2.7.2 Isolierung von Gesamt-DNA aus *Phaeodactylum tricornutum*

Die Isolierung von Gesamt-DNA aus Transformanten von *P. tricornutum* zur Kontrolle des integrierten Reportergen-Konstrukts (Kap. 2.11) erfolgte unter Verwendung des QIAamp Tissue Kit der Firma Qiagen. Dazu wurde Zellmaterial von transformierten Kolonien in je 150 ml f/2 Medium überführt und 28 Tage kultiviert (Kap. 2.6.2). Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation vom Medium befreit und durch Mörsern in flüssigem N₂ mechanisch aufgebrochen. Die Isolierung der DNA erfolgte entsprechend den Herstellerangaben.

2.7.3 Arbeiten mit RNA

2.7.3.1 Grundlagen des Arbeitens mit RNA

Zur Inhibierung von RNasen wurden alle wässrigen Lösungen mit 1/1000 Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, geschüttelt, über Nacht inkubiert und anschließend autoklaviert (121°C, 1bar, 20 min). Glasgefäße wurden durch vierstündiges Erhitzen auf 180°C sterilisiert, Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße durch 40minütiges Autoklavieren (121°C, 1 bar). Arbeitsflächen sowie Pipetten, Pinzetten und weitere Arbeitsgegenstände wurden durch Behandlung mit RNaseAway™ (Invitrogen) von potentiellen RNase-Kontaminationen gereinigt.

2.7.3.2 Isolation von Gesamt-RNA aus verschiedenen Algenspezies

Zur Isolation von RNA aus *Emiliania huxleyi* und *Cyanophora paradoxa* wurde Zellmaterial von Algenkulturen zum Zellaufbruch in flüssigem Stickstoff durch Mörsern fein zerkleinert. Die Isolation von Gesamt-RNA erfolgte mittels TRIzol® Reagenz (Invitrogen) entsprechend den Herstellerangaben. Isolierte RNA wurde in doppelt destilliertem H₂O aufgenommen und 1/10 Volumen zur Qualitätskontrolle auf einem 0,7%igen Agarosegel eingesetzt. Die isolierte Gesamt-RNA wurde bei -80° C gelagert.

Gesamt-RNA aus *Chara vulgaris*, *Mesostigma viride*, *Pavlova lutheri* und *Prymnesium parvum* wurde unter Verwendung von Polyclar AT von René Teich, TU Braunschweig, isoliert (Teich *et al.* 2006).

2.7.3.3 Konzentrationsmessung von RNA-Präparationen

Die Konzentration von RNA wurde durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine OD₂₆₀=1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Die Reinheit der RNA kann über das Verhältnis der OD bei 260 nm zur OD bei 280 nm bestimmt werden, welches für proteinfreie Lösungen bei 1,8-2,0 liegt (Mülhardt 2002).

2.7.3.4 Aufreinigung von poly(A)⁺-RNA aus verschiedenen Algenspezies

Die Aufreinigung von poly(A)⁺-RNA aus isolierter Gesamt-RNA von *E. huxleyi*, *C. paradoxa*, *M. viride* sowie *P. tricornutum* erfolgte unter Verwendung des Oligotex™ mRNA Mini Kit (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben. 1/10 Volumen der isolierten poly(A)⁺-RNA wurde zur Qualitätskontrolle auf ein 0,7%iges Agarosegel aufgetragen. Isolierte poly(A)⁺-RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Aufreinigung von poly(A)⁺-RNA aus *Chara vulgaris*, *Pavlova lutheri* und *Prymnesium parvum* erfolgte mittels Oligo-(dT)-Cellulose (Amersham Pharmacia) durch René Teich, TU Braunschweig (Teich *et al.* 2006).

2.8 RT-PCR Experimente zur partiellen Amplifikation von Transkripten für die GPI, den cytosolischen und den plastidären Weg der IPP-Biosynthese

2.8.1 Erstellung von Aminosäure-Alignments zur Konzeption degenerierter Primer

Um innerhalb der Gene für die zu untersuchenden Proteine konservierte Bereiche für die Primerkonzeption (Kap. 2.8.2, Kap. 3.1) zu detektieren, wurden Aminosäure (AS)-Alignments von bekannten AS-Sequenzen anderer Organismen angefertigt. Die jeweiligen Sequenzen wurden dazu mit Hilfe des Programms CLUSTAL_X (Thompson *et al.* 1997) Version 1.81 verglichen. Aus den hierbei gebildeten Phylip-Dateien wurden mit der "ProtDist"-Funktion des Phylip Programm-Pakets Punkt-Alignments erstellt. Punkt-Alignments führen Aminosäure-Positionen der verschiedenen Organismen, die mit der als Referenz definierten Sequenz übereinstimmen, nicht gesondert auf, sondern stellen sie durch einen Punkt dar. Diese Darstellungsweise vereinfacht die Detektion von konservierten Bereichen. Ein exemplarischer Ausschnitt aus dem Punkt-Alignment der DXR findet sich in Abbildung 14 (Kap. 3.1). Bei allen im Rahmen dieser Arbeit erstellten Alignments diente die jeweilige AS-Sequenz aus *Arabidopsis thaliana* (Accession Nummern siehe Kap. 1.6 bzw. Kap. 3.1) als Referenz.

2.8.2 Konzeption degenerierter Primer zur Amplifikation unbekannter Transkripte der GPI und der Gene der IPP-Biosynthesewege

Aus den meisten im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Organismen lagen kaum Sequenzinformationen über die GPI und keinerlei Sequenzinformationen von Genen aus den IPP-Biosynthesewegen vor. Daher wurden die erstellten Aminosäure-Alignments (Kap. 2.8.1) der einzelnen Enzyme auf hochkonservierte Sequenzbereiche durchsucht und degenerierte Primer gegen diese Abschnitte konzipiert, welche anschließend zur Amplifikation von Fragmenten der unbekannten Transkripte eingesetzt wurden. Die Primer wurden in ihrem GC-Gehalt den zu untersuchenden Spezies angepasst. Alle in dieser Arbeit untersuchten Organismen weisen einen sehr hohen GC-Gehalt der DNA von ca. 65% auf, was auf die bevorzugte Verwendung von Guanin und Cytosin in Wobble-Positionen zurückzuführen ist. Daher wurde bei der Konzeption der Primer an degenerierten Stellen meist auf die Integration von Adenin oder Thymin verzichtet. Hierdurch wird zum einen der Degenerierungsgrad der Primer und damit die Anzahl nicht bindender Basen-Kombinationen gesenkt. Zum zweiten steigt die Schmelztemperatur der Primer mit zunehmendem GC-Gehalt, wodurch sich die Annealing-Temperatur bei der PCR-Reaktion erhöhen und somit die Spezifität der Bindung steigern lässt. Abbildung 11 zeigt exemplarisch die Konzeption des Primers P396(+) für die cytosolische HMGS.

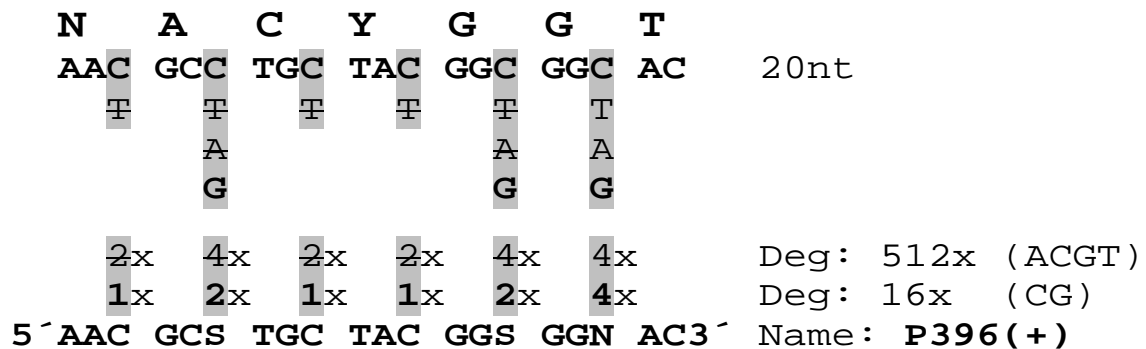


Abb. 11: Konzeption des degenerierten Primers P396(+). Obere Reihe: AS-Sequenz des konservierten Bereiches. **Grau unterlegt:** degenerierte Positionen. Durchgestrichen: bei der Konzeption zur Erhöhung des GC-Gehaltes nicht berücksichtigte mögliche Nukleotide. Untere Reihe: Nukleotid-Sequenz des degenerierten Primers in 5'->3'-Richtung. **nt:** Nukleotide. **Deg:** Degenerierungsgrad

Die im Rahmen dieser Arbeit konzipierten und eingesetzten degenerierten Primer sind im Anhang (Kap. 6.1) aufgeführt.

2.8.3 Konzeption sequenzspezifischer Primer zur Amplifikation von Transkripten der GPI und der IPP-Biosynthesewege

Zur Amplifikation von cDNA-Sequenzen aus *E. huxleyi* und *P. tricornutum* wurden anhand der aus den Rohdaten der Total-Sequenzierungsprojekte (Kap. 1.3, Kap. 3.1) gewonnenen genomischen Sequenzen spezifische Primer konzipiert. Aus *P. parvum* ist eine partielle Sequenz der DXR (DV098488) in der NCBI-Datenbank hinterlegt, anhand derer für dieses Gen ebenfalls spezifische Primer konzipiert wurden. Zur Amplifikation der fast vollständigen HMGS aus *M. viride* wurden durch die Amplifikation mit degenerierten Primer Sequenzinformationen gewonnen, die anschließend zur Konzeption von genspezifischen Primern genutzt wurden.

Mögliche Primersequenzen wurden mit Hilfe des Programms Oligo Analyzer im Hinblick auf die Ausbildung von Sekundärstrukturen sowie Hybridisierungen mit Gegenstrang-Primern untersucht, außerdem wurde die Schmelztemperatur kontrolliert. Um die Spezifität der Bindung zu steigern, wurden Oligonukleotide mit einer Mindestlänge von 17 nt konzipiert. Die Schmelztemperaturen von Primerpaaren wurden aufeinander abgestimmt und betrugen in der Regel zwischen 68 und 76°C.

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten spezifischen Primer sind im Anhang (Kap. 6.2) aufgeführt.

2.8.4 Durchführung von RT-PCR Experimenten

Es wurden RT-PCR Experimente zur Amplifikation der Transkripte der GPI sowie aller in Kapitel 1.6 aufgeführten an der cytosolischen oder der plastidären Biosynthese von Isopentenyl Pyrophosphat (IPP) beteiligten Gene durchgeführt.

Die Reverse Transkription erfolgte unter Verwendung des ThermoScript™ RT-PCR System Kit (Invitrogen) entsprechend den Herstellerangaben. Es wurden jeweils 10 µl Gesamt-RNA bzw. poly(A)⁺-RNA eingesetzt, sowie 1 µl (50 µm) des Oligo(dT)-Primers und 2 µl (20 µm) dNTP-Mix. Auf die Zugabe von H₂O zum cDNA-Synthesis Mix wurde verzichtet, das Endvolumen der Reaktionen betrug 20 µl. Die Elongationsphase für die Erststrangsynthese bestand aus einem Zyklus von jeweils 20 min bei 50°C, bei 55°C, bei 60°C und bei 65°C.

Für die PCR-Reaktionen wurde jeweils 1 µl des RT-Ansatzes unverdünnt eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte mittels der AccuPrime™ GC-Rich Polymerase (Invitrogen) entsprechend den Herstellerangaben unter Verwendung des mitgelieferten Puffer A. Die Elongationszeit richtete sich nach der erwarteten Größe der jeweils zu amplifizierenden

Fragmente und betrug 1min/kb. Um unspezifische Amplifikationen zu verhindern, wurde eine „Touchdown“-PCR durchgeführt: in den ersten fünf Zyklen der Reaktion wurde eine sehr hohe Annealing-Temperatur im Bereich der Schmelztemperatur der Primer gewählt, die jeweils nach 5 Zyklen schrittweise um 4° C gesenkt wurde. Nach 3 x 5 Zyklen mit stetig sinkender Annealing-Temperatur wurden 35 Zyklen mit der endgültigen Annealing-Temperatur durchlaufen, die bei spezifischen Primern ca. 15° C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer lag.

Zur Aufreinigung des Amplifikats wurde der Reaktionsansatz auf einem Agarosegel aufgetrennt, Amplifikate mit der erwarteten Größe aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA mittels des GeneClean Turbo Kit (Bio 101) aus dem Gel eluiert und in 14,2 µl doppelt destilliertem H₂O aufgenommen. Nach Zugabe von 10 µM dATP, Taq-Puffer und 1 U Taq-Polymerase wurde der Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl für 1 h bei 72° C inkubiert, um an die glatten Enden des Amplifikats ein zusätzliches, 3'-überhängendes Adenin anzufügen, welches für die Ligation in den PCR-Ligationsvektor pCR®2.1 aufgrund dessen überstehender Thymidin-Reste nötig ist. Das Amplifikat wurde anschließend wiederum unter Verwendung des GeneClean Turbo Kit bzw. mit Quick-Clean (Bioline) aufgereinigt und in 20 µl doppelt destilliertem H₂O aufgenommen. Die Konzentration des Amplifikats wurde bestimmt und zur Ligation wurden ca. 50 µg mit 12,5 µg pCR®2.1-Vektor und 1 U T4-DNA-Ligase (Invitrogen bzw. Fermentas) bei 12° C ü. N. inkubiert. Der Ligationsansatz wurde anschließend phenolisiert, mit EtOH unter Zugabe von 20 µg Glycogen gefällt und in 15 µl doppelt destilliertem H₂O aufgenommen. 5 µl wurden zur Transformation selbst hergestellter chemisch kompetenter *E. coli* XL1blue MRF' Zellen (Kap. 2.4) eingesetzt.

2.9 Screening von genomischen und cDNA-Banken zur Isolierung von Genen für die GPI, die DXR und die HMGR

Im Zuge dieser Arbeit wurden Gene für die Glucose-6-Phosphat Isomerase (GPI) aus einer genomischen λ-EMBL3-Bank von *Cyanophora paradoxa* sowie aus λ-cDNA-Banken des Cryptophyten *Hanusia phi* (NM1149-Bank), dem Ciliaten *Paramecium tetraurelia* (ZapExpress-Bank) und den Dinophyten *Pyrocystis lunula* und *Lingulodinium polyedrum* (jeweils ZapII-Bank) isoliert. Des Weiteren wurden Gene für die DXR (pla-2) aus einer genomischen EMBL3-Bank des Haptophyten *Prymnesium parvum* und aus den cDNA-Banken des Cryptophyten *Hanusia phi* und des Dinophyten *Pyrocystis lunula* isoliert. Aus

einer ZapII-cDNA-Bank der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* wurde das Gen für die HMGR (cyt-2) isoliert.

Zur Herstellung homologer Sonden wurden durch PCR mit degenerierten Primern Fragmente der Gene amplifiziert; als Matrizen dienten cDNA aus *Hanusia*, *Prymnesium* und *Phaeodactylum*, makronukleäre DNA aus *Paramecium* sowie Massenexzisionen der cDNA-Banken von *Pyrocystis* und *Lingulodinium*. Die Amplifikate wurden mit [α - 32 P]-dCTP markiert und die Sonden-DNA über Sephadex-G50-Säulen aufgereinigt. Die Banken wurden mit einer Konzentration von jeweils ca. 10^5 pfu/Platte unter Verwendung von *E. coli* KW251 (Kap 2.4) auf LB-Platten ausplattiert, die Replika-Filter bei ca. 60°C für eine Dauer von 6-12 h mit den Sonden hybridisiert und anschließend mit 0,3 x SSPE gewaschen.

2.10 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen wurden als Auftragsarbeit von der Firma SeqLab Sequencing Laboratories (Göttingen) durchgeführt. Sämtliche DNA wurde doppelsträngig sequenziert. Die Elektropherogramme wurden mittels des Programms Edit View 1.0.1 (Applied Biosystems) visualisiert, die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte unter Verwendung des MacMolly Programm-Paketes (Mologen).

2.11 Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Proteinen der IPP-Biosynthesewege in *Phaeodactylum tricornutum*

Mit Hilfe des für *Phaeodactylum* etablierten Systems zur stabilen Transformation (s. u.) sollte die subzelluläre Lokalisierung verschiedener Enzyme des MVA- und des MEP-Stoffwechselwegs in dieser Diatomee analysiert werden. Hierzu wurden Reportergenkonstrukte mit einer auf die Codon Usage von *Phaeodactylum* abgestimmten Form des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP) (eGFP, enhanced green fluorescent protein) hergestellt. Diese wurden unter Verwendung des Transformations-Vektors pPha-T1 (s. u.) in *Phaeodactylum* transformiert, und die Lokalisation des Reportergen-Konstrukts innerhalb der Zelle durch Detektion der Fluoreszenz des eGFP mittels eines Fluoreszenz-Mikroskops festgestellt.

2.11.1 Der *Phaeodactylum* Transformations-Vektor pPha-T1

Phaeodactylum tricornutum Bohlin (UTEX 646) gehört zu den wenigen Algengruppen, die genetisch transformiert werden können. Das von Apt *et al.* etablierte System (Apt *et al.* 1996, Zaslavskaja *et al.* 2000) bringt Transgen-Konstrukte durch biolistischen Transfer mittels einer Helium-Partikelkanone in die *Phaeodactylum*-Zelle ein. Das Transgen integriert ungerichtet stabil in das Kerngenom der Alge. Der dafür konstruierte Transformations-Vektor pPha-T1 (Zaslavskaja *et al.* 2000) basiert auf dem Vektor pSP73 (Promega, Madison, WI). Er enthält eine modifizierte multiple cloning site (MCS) mit einer Vielzahl von Restriktions-Schnittstellen, in die das Transgen gerichtet kloniert werden kann. Die MCS wird flankiert vom Promotor- und Terminator-Bereich des hochexprimierten homologen *fcpA* Genes (Fucoxanthin Chlorophyll a bindendes Protein) aus *Phaeodactylum* (Bhaya und Grossman 1993), welcher eine starke Expression des Transgens vermittelt. Der Vektor umfasst eine Zeocin-Resistenz zur Selektion von Transformanten. Das entsprechende Gen wurde ursprünglich aus dem Actinobakterium *Streptoalloteichus hindustanus* isoliert und trägt daher die Bezeichnung *sh ble* (ble: Bleomycin, entspricht Zeocin). Der Vektor enthält zusätzlich eine Ampicillin-Resistenz (Amp) und den *E. coli* Replikationsstart (origin of replication, ori), und kann somit in *E. coli* amplifiziert werden.

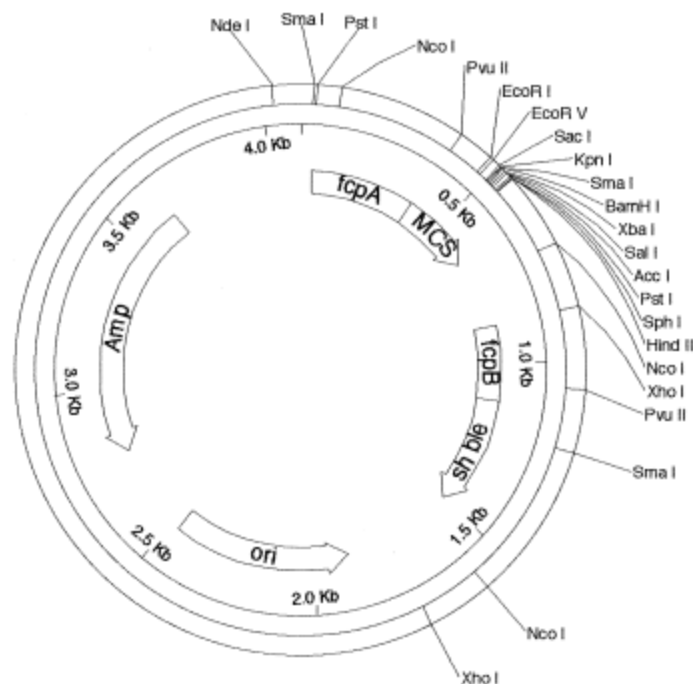


Abb. 12: Karte des *Phaeodactylum* Transformations-Vektors pPha-T1 (Accession AF219942). **MCS:** multiple cloning site. **fcpA/B:** Promotoren der *Phaeodactylum*-Gene *fcpA/B* (s. Text). **sh ble:** Zeocin-Resistenzgen. **ori:** *E. coli* origin of replication. **Amp:** Ampicillin-Resistenzgen. Aus Zaslavskaja *et al.* (2000).

2.11.2 Herstellung von eGFP-Reporter-gen-Konstrukten zur Untersuchung der Lokalisation der DXS, DXR und HMGR in *Phaeodactylum*

Es wurde die Lokalisation der HMGR aus dem MVA-Weg sowie der DXS und DXR aus dem MEP-Weg analysiert. Hierzu wurde das *eGFP*-Gen an das 3'-Ende eines Fragments des zu untersuchenden Gens kloniert, welches den N-Terminus (einschließlich des Start-Codons und gegebenenfalls einer entsprechenden Signal-Transit-Sequenz) sowie einen Teil des reifen Proteins umfasste. Beide Fragmente wurden inframe in die MCS des pPha-T1-Vektors kloniert, so dass eine Expression unter dem *fcpA*-Promotor stattfand. Das *eGFP* war ursprünglich zur Amplifikation gerichtet in den multiple copy Vektor pBluescript SK+ kloniert und wurde durch Spaltung mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *HindIII* herausgeschnitten.

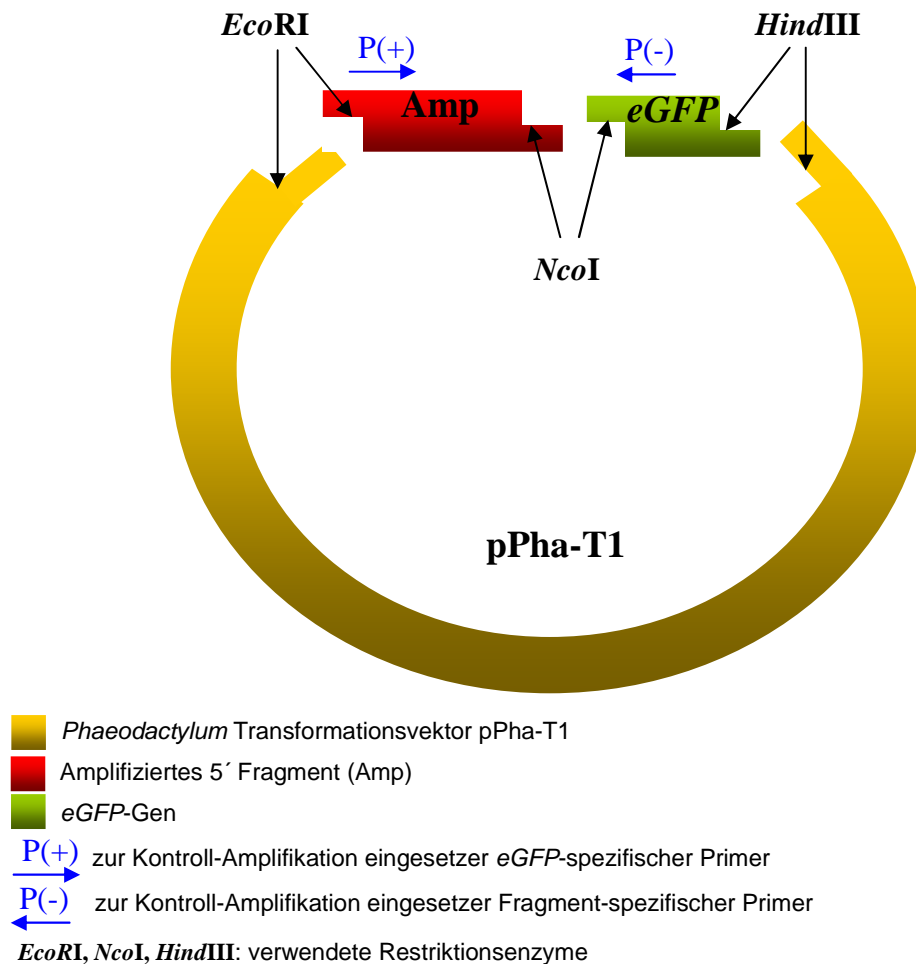


Abb. 13: Schema der Klonierungsstrategien für die Erstellung von Reporter-gen-Konstrukten zur Analyse der subzellulären Lokalisation der HMGR, DXS und DXR in *Phaeodactylum tricornutum*.

Die *Nco*I-Schnittstelle (CC↓**ATGG**) umfasst das Startcodon des *eGFP*, sodass das Gen direkt hinter das zu analysierende Fragment kloniert wird. Die Fragmente der HMGR, DXS und DXR wurden durch Amplifikation mit spezifischen Primer hergestellt. Für die HMGR diente hierbei der aus einer cDNA-Bank isolierte Klon aus *Phaeodactylum* (Kap. 3.5.7) als Matrize, die Fragmente der DXS und DXR wurden durch RT-PCR aus poly(A)⁺-RNA (Kap. 2.8.4) amplifiziert. Die spezifischen Primer wurden anhand der aus der NCBI-Datenbank etablierten genomischen Sequenz konzipiert und zur gerichteten Klonierung des Fragments jeweils um eine Restriktionsschnittstelle erweitert. Dabei wurde anhand der bekannten cDNA- bzw. genomischen Sequenzinformation kontrolliert, dass die gewählten Schnittstellen nicht weitere Male innerhalb des zu amplifizierenden Fragments vorkamen. Die Amplifikate wurden im Anschluss an die PCR mit den entsprechenden Enzymen gespalten und so mit unterschiedlichen sticky ends an 5' bzw. 3'-Ende versehen. In allen Fällen wurde durch den reverse-Primer am 3'-Ende des Fragments eine *Nco*I-Schnittstelle derart eingefügt, dass *eGFP* inframe an das Fragment ligiert werden konnte. Der forward-Primer fügte an den 5'-Terminus jeweils eine *Eco*RI-Schnittstelle an.

Das amplifizierte Fragment des zu untersuchenden Gens und *eGFP* wurden anschließend in einem gemeinsamen Ligationsansatz in den mit *Eco*RI und *Hind*III gespaltenen pPha-T1-Vektor ligiert. Dabei wurden ca. 50 ng Fragment und 50 ng *eGFP* zusammen mit 25 ng pPha-T1/*Eco*RI/*Hind*III in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 1 U T4-Ligase bei 12 °C ü. N. inkubiert. Abbildung 13 zeigt schematisch die Klonierungsstrategie für die Fragmente der HMGR, DXS und DXR. Das Konstrukt wurde in *E. coli* XL1Blue MRF' transformiert, im analytischen Maßstab aufgereinigt und zur Kontrolle sequenziert.

2.11.3 Stabile genetische Transformation von *Phaeodactylum tricornutum* mittels Helium-Partikel-Kanone

Die Transformation von *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin (UTEX 646) erfolgte prinzipiell wie in Apt *et al.* (1996) und Zaslavskaja *et al.* (2000) beschrieben. Es wurde das Biolistic®-PDS-1000/He Particle Delivery System der Firma Biorad entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Die zu transformierenden Zellen wurden zuvor in Flüssigkultur angezogen (Kap. 2.6.2). Zur Transformation wurden jeweils ca. 10⁶ Zellen in der Mitte einer f/2-Platte auf einer kreisförmigen Fläche von ca. 4 cm Durchmesser ausplattiert.

Von den Reporter-gen-Konstrukten (Kap. 2.11.2) wurden jeweils ca. 15 µg DNA pro Transformationsvorgang an Wolfram-Microcarrier gebunden und unter Verwendung unterschiedlicher Berstscheiben bei Drücken von 650 psi, 900 psi, 1100 psi und 1350 psi auf die ausplattierten Zellen geschossen.

Die Transformations-Platten wurden ca. 24 h unter Dauerbeleuchtung mit ca. 75-100 µE inkubiert, anschließend wurden die Zellen mit 1 ml f/2-Medium abgelöst, auf 4 frische f/2-Platten ausgestrichen und für 21 Tage inkubiert (Kap. 2.6.2).

2.11.4 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung und fotografische Dokumentation transformierter *Phaeodactylum*-Zellen mittels eines konfokalen Laserscanning Mikroskops

Zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurde Zellmaterial von transformierten Kolonien in 10 ml Flüssigmedium überführt und für 10 Tage kultiviert (Kap. 2.6.2), um die Teilung der Zellen zu beschleunigen und so den Anteil abgestorbener, nicht mehr analysierbarer Zellen zu verringern.

Transformierte *Phaeodactylum* Zellen wurden aus der Flüssigkultur steril entnommen und mit Hilfe eines konfokalen LSM gescannt. Dabei wurde das eGFP durch Laserbestrahlung mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Zur Verifizierung des eGFP wurde die Emission bei der für dieses Chromophor charakteristischen Wellenlänge von 515-520 nm kontrolliert. Transformanten mit deutlicher und eindeutig zu lokalisierender Fluoreszenz wurden zur Dokumentation fotografiert.

2.11.5 Nachweis der Reporter-gen-Konstrukte in transformierten *Phaeodactylum*-Zellen

Für die dokumentierten *Phaeodactylum*-Transformanten sollte die tatsächliche Integration des jeweiligen Reporter-gen-Konstrukts in das Genom nachgewiesen werden, um eventuelle Kontaminationen auszuschließen. Dazu wurde Gesamt-DNA aus in Flüssigkultur angezogenen Zellen isoliert (Kap. 2.7.2). Diese wurde zur PCR-Amplifikation unter Verwendung eines eGFP-spezifischen sowie je eines Vektor-spezifischen Primers (Kap. 3.6) eingesetzt. Beide Primer binden nicht an die genomische DNA des Wildtyps, sondern ausschließlich an das integrierte Reporter-gen-Konstrukt. Die amplifizierten Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, anschließend eluiert, in pCR®2.1 kloniert und sequenziert.

2.12 Phylogenetische Analysen

Die abgeleiteten AS-Sequenzen der in dieser Arbeit isolierten und sequenzierten sowie durch Internetrecherche *in silico* etablierten Glucose-6-Phosphat Isomerasen (GPI) und der Enzyme für den MVA- und den MEP-Weg der IPP-Biosynthese wurden phylogenetischen Analysen unterzogen. Dafür wurden unter Verwendung von CLUSTAL_X (Thompson *et al.* 1997) (Version 1.81) Alignments erstellt und diese mit der ED-Option des MUST Programm-Pakets (Philippe 1997) manuell optimiert. Alle GPI-Datensätze wurden mit zwei verschiedenen Maximum Likelihood (ML) Methoden analysiert, die Bestandteil von Treefinder (TF; Jobb *et al.* 2004) bzw. der PhyML-Version 2.4 (Guindon und Gascuel 2003) sind. Alle Datensätze der IPP-Biosynthese wurden mit Treefinder analysiert. In allen Analysen wurde ein Modell basierend auf der Whelan and Goldman (WAG)-Matrix für Aminosäure-Substitutionen gewählt (WAG+F+ Γ 4 Modells). Bei den in dieser Arbeit dargestellten GPI-Stammbäumen handelt es sich um Treefinder- oder Phylip Maximum Likelihood (PhyML)-Topologien, bei den Stammbäumen für Enzyme der IPP-Biosynthese um Treefinder-Topologien. Um die Unterstützung für die internen Verzweigungen der Treefinder-Bäume abzuschätzen, wurden Bootstrap-Analysen mit 100 Wiederholungen durchgeführt. Für die PhyML-Bäume der GPI wurde ein separater Phylip-Bootstrap Consensus-Baum mit 1000 Wiederholungen durch die CONSENSE-Option des Phylip Programm-Pakets errechnet (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>).

3 Ergebnisse

3.1 *In silico* Etablierung von Referenz-Sequenzen und Erstellung von Aminosäure-Alignments

Zu Beginn dieser Arbeit waren nur wenige Sequenzen von Glucose-6-Phosphat Isomerasen (GPI) sowie von Genen für die an der IPP-Biosynthese beteiligten Proteine der verschiedenen in dieser Arbeit untersuchten Vertretern der Plantae (Streptophyta/Chlorophyta, Rhodophyta und Glaucophyta) sowie der Alveolata (Dinophyta, Apicomplexa, *Perkinsus* und Ciliaten) und der "Chromista" (Haptophyta, Stramenopile und Cryptophyta) publiziert. Daher wurden Aminosäure (AS)-Alignments aus den bekannten Sequenzen von Pflanzen, Tieren und Pilzen erstellt (Kap 2.8.1), um AS-Bereiche zu identifizieren, die zwischen den verschiedenen Spezies konserviert sind und folglich auch in den Proteinen der hier untersuchten Algen erhalten sein sollten. Von der jeweiligen AS-Sequenz solcher Bereiche ausgehend wurden unter Berücksichtigung der Wobble-Positionen degenerierte Primer konzipiert (Kap. 2.8.2) und zur PCR-Amplifikation von Genfragmenten aus den verschiedenen Algenspezies verwendet. Diese Amplifikate können als Sonden zum Screenen von Genbanken eingesetzt werden, oder bei ausreichender Sequenzlänge direkt zur phylogenetischen Analyse herangezogen werden. Durch RT-PCR amplifizierte cDNA-Fragmente belegen darüber hinaus die Expression des untersuchten Gens und dienen als Referenz zur Bestimmung der exakten Position von Introns in genomischen Sequenzen.

Zur Erstellung der AS-Alignments für die GPI, die fünf Gene des MVA- und die sieben Gene des MEP-Pathways (Kap. 1.6) sowie zur späteren phylogenetischen Analyse dieser Gene wurden die AS-Sequenzen von in der NCBI-Datenbank annotierten Proteinen aus Landpflanzen, Tieren, Pilzen, Eubakterien und Archaeen verwendet. Sie wurden durch Stichwortsuche bzw. durch die BLAST-Option der Proteindatenbank etabliert. Nicht als Proteinsequenz annotierte Referenzsequenzen aus folgenden Landpflanzen stammen aus den jeweiligen Sequenzierungsprojekten ("Plant Genome Database" PGD; <http://www.plantgdb.org/> bzw. "The Compositae Genome Project" CGP; <http://compgenomics.ucdavis.edu/>) oder wurden aus in der NCBI-Datenbank verfügbaren EST-Einzelsequenzen assembliert: *Brassica napus*, *Glycine soja*, *Gossypium raimondii*, *Helianthus annuus*, *Lycopersicon esculentum*, *Medicago truncatula*, *Nicotiana tabacum*, *Picea glauca* und *Populus trichocarpa*.

3 Ergebnisse

Sequenzen aus der Chlorophyceae *Chlamydomonas reinhardtii* (außer der bereits annotierten DXS, Acc. CAA07554) und aus der Diatomee *Thalassiosira pseudonana* wurden durch Recherche in den Datenbanken des Joint Genome Institute (JGI; USA) etabliert (<http://genome.jgi-psf.org/Chlre3/Chlre3.home.html>; <http://genome.jgi-psf.org/thaps1/thaps1.home.html>). EST-Sequenzen aus den Haptophyten *Prymnesium parvum* und *Pavlova lutheri* stammen aus den jeweiligen EST-Projekten des Plant Genome Network (PGN, <http://pgn.cornell.edu>) bzw. des Protist EST Program (früher PEPdb, jetzt TBestDB, <http://tbestdb.bcm.umontreal.ca/searches/login.php>) und sind inzwischen teilweise in der EST-Datenbank des NCBI hinterlegt. Sequenzen aus dem Apicomplexen *Babesia bigemina* stammen aus den Rohdaten des Sequenzierungs-Projekts des Sanger Institute, UK (http://www.sanger.ac.uk/Projects/B_bigemina/). Vorläufige Sequenzen aus dem Alveolaten *Perkinsus marinus* sowie Sequenzen aus dem amitochondrialen Eukaryoten *Trichomonas vaginalis* wurden von "The Institute for Genomic Research" (TIGR; <http://www.tigr.org>) etabliert. Die Sequenzen aus den Rhodophyten *Cyanidioschyzon merolae* und *Galdieria sulphuraria* stammen aus dem "Cyanidioschyzon merolae Genome Project" (CMGP; <http://merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp/>) bzw. der *Galdieria*-Datenbank (Michigan State University Galdieria Database; <http://genomics.msu.edu/galdieria>). Das Genom von *Cyanidioschyzon* ist bereits vollständig sequenziert (Misumi *et al.* 2005), und die Gene sind in der Datenbank annotiert.

Folgende Sequenzen wurden durch MEGABLAST aus TRACE-Files der NCBI-Datenbank assembliert: Genomische Sequenzen aus dem Haptophyten *Emiliania huxleyi*, der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum*, den Ciliaten *Paramecium tetraurelia* und *Tetrahymena thermophila* und der Chlorophyceae *Volvox carteri*; genomische und EST-Sequenzen aus dem Moos *Physcomitrella patens* und dem Bärlappgewächs *Selaginella moellendorffii*; EST-Sequenzen aus dem Monokotyledonen *Zea mays* und der Gymnosperme *Pinus taeda*. Es wurden homologe Sequenzen aus anderen Organismen zur BLASTN-Suche eingesetzt. Die gefundenen Sequenzen wurden für weitere BLASTN-Suchen eingesetzt, um vollständige Gene aus überlappenden Einzelsequenzen zu etablieren.

Unter Verwendung aller etablierten Referenz-Sequenzen wurden AS-Alignments für die in dieser Arbeit untersuchten Gene erstellt (Kap. 2.8.1). Als Referenz für die Nummerierung dienten im Verlauf der gesamten Arbeit jeweils die entsprechenden Proteine aus *Arabidopsis*. Abbildung 14 zeigt exemplarisch einen Ausschnitt aus dem Alignment der DXR, des zweiten Enzyms des plastidären MEP-Pathways.

3 Ergebnisse

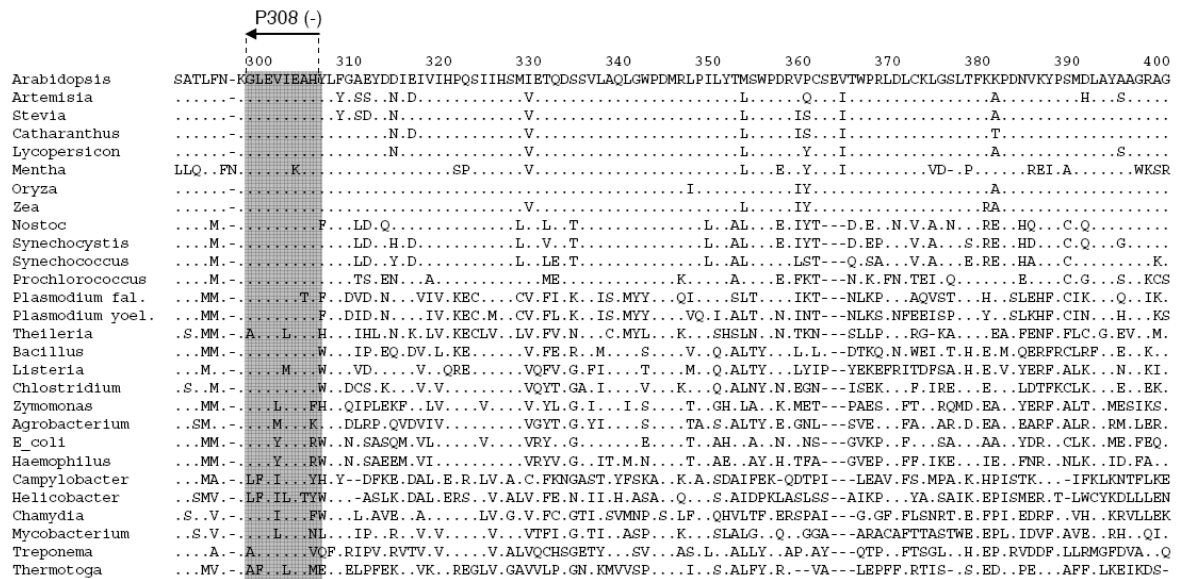


Abb. 14: Ausschnitt aus dem Aminosäure-Alignment der Deoxy-Xylulose Phosphat Reductoisomerase (MEP-Pathway). Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf die Sequenz des Proteins aus *Arabidopsis thaliana* (NP_201085). **Grau unterlegt** ist ein in allen Organismen konservierter AS-Bereich, anhand dessen Sequenz der degenerierte Primer P308(-) konzipiert wurde.

3.2 Konzeption degenerierter Primer zur Amplifikation von unbekannten Genfragmenten

Konservierte Aminosäure-Bereiche der verschiedenen Proteine wurden zur Konzeption degenerierter Primer genutzt. Diese sollten zur Amplifikation von cDNA- bzw. Gen-Fragmenten der unbekannten Gene aus verschiedenen Algenspezies eingesetzt werden. Es wurden degenerierte Primer für die cytosolische und die plastidäre Glucose-6-phosphat Isomerase (Glykolyse/Gluconeogenese, Kap. 1.5) sowie für die Gene aller Enzyme aus dem MVA- und dem MEP-Pathway der Isoprenoid-Biosynthese konzipiert (Kap. 1.6), die dem relativ hohen GC-Gehalt der DNA der untersuchten Organismen von bis zu ca. 65% angepasst wurden (Kap. 2.8.2). Abbildung 14 zeigt exemplarisch die Lage des Primers mit der Bezeichnung P308(-) innerhalb der Aminosäuresequenz der DXR. Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit konzipierten und zur Amplifikation von Fragmenten der verschiedenen Gene eingesetzten degenerierten Primer sind im Anhang aufgeführt (Kap. 7.1).

3.3 Die Verbreitung der Glucose-6-phosphat Isomerase in den Plantae, den Alveolaten und den "Chromista"

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden erstmalig Sequenzen für die Glucose-6-Phosphat Isomerase (GPI, EC 5.3.1.9) aus Dinophyten, Cryptophyten, Ciliaten und dem Glaucophyten *Cyanophora paradoxa* etabliert. Zusammen mit den bereits im Rahmen der Diplomarbeit (Grauvogel 2003) etablierten Daten wurde somit ein umfassender Datensatz erstellt, der zur Analyse der Verbreitung und der phylogenetischen Beziehungen dieses Gens herangezogen wurde. Die bisher nicht untersuchte Verbreitung der cytosolischen und der plastidären GPI in Vertretern der Plantae (Chlorophyten, dem primitiven Streptophyten *Mesostigma viride*, Rhodophyten und dem Glaucophyten *Cyanophora paradoxa*) wurde charakterisiert und die phylogenetischen Beziehungen der Sequenzen analysiert.

3.3.1 Etablierung einer cytosolischen und einer partiellen plastidären GPI aus der Grünalge *Mesostigma viride*

Mehrere kürzlich veröffentlichte Arbeiten belegen die Zugehörigkeit von *Mesostigma viride* zu den Streptophyten (Kap. 1.6.3). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die für Landpflanzen charakteristische Präsenz einer cytosolischen und einer plastidären Isoform der GPI auch in diesem evolutiv gesehen primitivsten Vertreter der Streptophyten nachgewiesen werden. Dazu wurde mit dem degenerierten Primerpaar P906/P022 eine fast vollständige (AS 10-520) cDNA-Sequenz der cytosolischen GPI durch RT-PCR aus poly(A)⁺-RNA amplifiziert. Unter Verwendung des anhand der gewonnenen Sequenzinformation konzipierten spezifischen Primers P872 konnte durch 3'-RACE-PCR mit dem GeneRacer™ Kit (Invitrogen) die 3'-terminale Sequenz des GPI-Gens etabliert werden. Die Sequenz der cytosolischen GPI wurde in der NCBI-Datenbank hinterlegt (Acc. DQ873405) und phylogenetisch analysiert (Kap. 3.3.7). Mit den degenerierten Primern P096(+) und P097(-) konnte darüber hinaus eine partielle Sequenz der plastidären Isoform aus *Mesostigma* amplifiziert werden, die den abgeleiteten AS-Bereich von AS 410 bis 522 umfasst. Die Sequenz des Amplifikats umfasst mit 113 AS lediglich ca. 18,4% der vollständigen Sequenz (A.t.: 613 AS) und wurde daher nicht in die phylogenetische Analyse einbezogen. Die Sequenz des Fragmentes befindet sich im Anhang (Kap. 7.4).

3.3.2 Isolierung und Sequenzierung von Genen für die GPI aus *Cyanophora paradoxa*, *Pyrocystis lunula*, *Lingulodinium polyedrum*, *Paramecium tetraurelia* und *Hanusia phi*.

Durch homologes Screening einer genomischen EMBL3-Bank von *Cyanophora paradoxa* (Pringsheim; SAG 29.80) konnte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit ein 5'-partieller Klon einer GPI isoliert werden, aus dem sich eine AS-Sequenz von 484 AS Länge ableiten lässt, die den Bereich von AS 75 (verglichen mit der AS-Sequenz aus *Arabidopsis*) bis zum Stop-Codon umfasst. Die Intronpositionen (Kap. 3.3.6) wurden durch den Vergleich mit einem RT-PCR-Amplifikat ermittelt. Der genomische Klon weist auf Aminosäure-Ebene eine Identität von 63% mit der Sequenz des bereits im Rahmen der Diplomarbeit (Grauvogel 2003) isolierten cDNA-Klons aus *Cyanophora paradoxa* (Kies; SAG 45.84) auf (Daten nicht gezeigt). Aufgrund von Analysen des Plastiden-Genoms wurde postuliert, dass es sich bei den beiden bisher als verschiedene Stämme (Pringsheim bzw. Kies) von *Cyanophora paradoxa* geführten Organismen um unabhängige Arten der Glaucophyten handeln könnte (Schwartzbach *et al.* 1998). Allerdings ist die niedrige Identität der beiden hier etablierten GPI-Sequenzen nicht allein auf Artunterschiede zurückzuführen, sondern sie deutet darauf hin, dass zwei unabhängige Gene isoliert wurden und die Genome beider Stämme noch das jeweils komplementäre Homolog enthalten.

Aus den Dinophyten *Pyrocystis lunula* und *Lingulodinium polyedrum* wurde cDNA als Substrat für die PCR-Amplifikation von Sondenfragmenten mit dem degenerierten Primerpaar P021/P022 eingesetzt (Kap. 2.9). Durch homologes Screening von λ -ZapII-Banken (freundlicherweise von W. Hastings, Harvard University, Cambridge, USA, zur Verfügung gestellt) wurden aus *Pyrocystis* und *Lingulodinium* je ein vollständiger cDNA-Klon mit einer abgeleiteten AS-Sequenz von 548 bzw. 547 AS Länge isoliert.

Aus dem Ciliaten *Paramecium tetraurelia* wurde eine homologe Sonde mittels PCR mit makronukleärer genomischer DNA hergestellt und zum Screenen einer λ -ZapExpress-cDNA-Bank (freundlicherweise von Jürgen Linder, Tübingen, zur Verfügung gestellt) eingesetzt. Es konnte ein 5'-unvollständiger GPI-Klon aus *Paramecium* isoliert werden, der mit einer abgeleiteten AS-Sequenzlänge von 563 AS den Bereich von AS 15 bis zum Stop-Codon umfasst.

Aus einer freundlicherweise von Marie Françoise Liaud, TU Braunschweig, zur Verfügung gestellten NM1149-cDNA-Bank des Cryptophyten *Hanusia phi* (vorher: *Cryptomonas phi*) (Liaud *et al.* 1997) wurde mittels heterologem Screen (Sonde aus *Cyanophora*) ein vollständiger cDNA-Klon mit einer abgeleiteten Länge von 560 AS isoliert.

Alle vor bzw. im Rahmen dieser Arbeit isolierten GPI-Klone wurden doppelsträngig sequenziert und anschließend phylogenetisch analysiert (Kap. 3.3.7). Die Sequenzen wurden in der NCBI-Datenbank hinterlegt, ihre Acc. Nr. finden sich im Anhang (Kap. 7.3.1).

3.3.3 Etablierung einer GPI aus *Emiliana huxleyi*

Aus den in der NCBI-Datenbank zugänglichen TRACE-Files (Kap. 3.1) wurde die genomische Sequenz einer GPI aus dem Haptophyten *Emiliana huxleyi* assembliert. Die TI (Trace Identity) Nummern der hierfür verwendeten TRACE-Files sind im Anhang aufgeführt (Kap. 7.6). Das Genom von *Emiliana* besteht aus ca. 220 Mbp, im Rahmen des Genomprojektes sind derzeit ca. 1,6 Mio. "single reads" etabliert (D. Baurain, Montreal, Kanada; pers. Mitteilung). Bei einer durchschnittlichen eindeutigen Sequenzlänge von 700 bp entspricht das mit ca. 1,12 Mrd. etablierten Basen einer fünffachen Abdeckung des Genoms. Diese genomischen Daten zeigen keine Hinweise auf das Vorkommen weiterer GPI-Gene im *Emiliana*-Genom. Zur Bestimmung der Intronpositionen wurde mittels RT-PCR mit den spezifischen Primern P669(+) und P670(-) (Kap. 7.2) ein cDNA-Fragment amplifiziert, das fast den vollständigen kodierenden Bereich des GPI-Gens umfasst (548 von 555 AS-Positionen), und mit der genomischen Sequenz verglichen. Die Sequenz enthält 16 Introns mit einer durchschnittlichen Länge von 233 nt, wobei das kleinste Intron aus 72 nt, das größte aus 341 nt besteht. Die Sequenz des RT-PCR-Amplifikats wurde in der NCBI-Datenbank hinterlegt (Acc. DQ812889). Die Sequenz wurde phylogenetisch analysiert (Kap. 3.3.7)

3.3.4 *In silico* Etablierung weiterer GPI-Sequenzen

Die Sequenzdaten aus den Genom-Projekten für die Diatomeen *Phaeodactylum tricornutum* und *Thalassiosira pseudonana* sind in der Datenbank des NCBI (*Phaeodactylum*; TRACE-Files) bzw. des JGI (*Thalassiosira*; <http://genome.jgi-psf.org/thaps1/thaps1.home.html>) verfügbar. Durch BLAST-Suche unter Verwendung der zu Beginn dieser Arbeit bereits aus *Phaeodactylum* isolierten genomischen Sequenz einer GPI (Grauvogel 2003) konnten drei weitere genomische Sequenzen von unabhängigen Glucose-6-Phosphat Isomerasen aus dieser Diatomee sowie die entsprechenden vier Homologe aus *Thalassiosira pseudonana* etabliert werden, welche in Tabelle 4 zusammengefasst sind.

3 Ergebnisse

Tab. 4: Etablierte Sequenzen von jeweils vier unabhängigen GPIs aus den *Diatomeen* *Phaeodactylum tricornutum* und *Thalassiosira pseudonana*.

Diatomee	GPI-Nr.	Herkunft der Sequenz	ESTs
<i>Phaeodactylum</i>	GPI-1	NCBI TRACE-Files	CD377263
	GPI-2	NCBI TRACE-files	CD379565
	GPI-3	NCBI TRACE-files	-
	GPI-4	Screening λ -EMBL3-Bank	BQ540144
<i>Thalassiosira</i>	GPI-1	JGI Scaffold_25	-
	GPI-2	JGI Scaffold_100	-
	GPI-3	JGI Scaffold_31	-
	GPI-4	JGI Scaffold_167	-

Für drei der vier GPI aus *Phaeodactylum* konnten EST-Sequenzen aus der NCBI-Datenbank etabliert werden. Die Sequenz der in meiner Diplomarbeit (Grauvogel 2003) etablierten GPI-4 aus *Phaeodactylum* wurde in der NCBI-Datenbank hinterlegt (Acc. DQ812891). Alle etablierten Sequenzen aus den Diatomeen wurden phylogenetisch analysiert (Kap. 3.3.7).

Durch intensive Datenbank-Recherchen konnte eine Vielzahl von Referenzsequenzen von Glucose-6-Phosphat Isomerasen etabliert werden. Neben den Homologen aus zahlreichen Eubakterien wurden auch aus fünf Vertretern der Archaea homologe GPI-Gene etabliert, wobei innerhalb dieses Reiches jedoch mehrheitlich ein nicht-homologes Enzym mit gleicher katalytischer Funktion verbreitet ist (Verhees *et al.* 2001; Rudolph *et al.* 2004). Darüber hinaus wurden Sequenzen aus Metazoen, Fungi, Protisten inklusive amitochondrialer Eukaryoten, Kinetoplastiden, sowie alle verfügbaren Sequenzen aus Vertretern der Plantae und der Alveolata etabliert (Kap. 3.1). Es wurden jeweils zwei unabhängige GPI-Gene aus den Rhodophyten *Galdieria sulphuraria* und *Cyanidioschyzon merolae* identifiziert. Aus dem alveolaten Parasiten *Perkinsus marinus* wurden zwei rezent duplizierte GPI-Sequenzen identifiziert, die in 94% der abgeleiteten AS-Sequenz und allen Intron-Positionen übereinstimmen (Daten nicht gezeigt).

3.3.5 Identifizierung einer N-terminalen Extension in GPI-Sequenzen der Plantae

Ausgehend von den in der NCBI-Datenbank annotierten cytosolischen GPI-Sequenzen der Landpflanzen konnten in dieser Arbeit homologe Sequenzen aus Vertretern der weiteren Gruppen der Plantae (Chlorophyta, Rhodophyta und Glaucophyta) identifiziert werden. Die Translation cytosolischer GPI startet im Allgemeinen innerhalb eines Bereiches von ca. fünf Aminosäuren verglichen mit der Referenz-Sequenz aus *Arabidopsis* (P34795) (Alignment nicht gezeigt). Die AS-Sequenzen der Chlorophyten *Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox carteri* und *Prototheca wickerhamii* (EST-Sequenz, EC183096) jedoch enthalten eine N-terminale Extension von mehr als 60 AS (s. Abb. 15). Auch aus den Rotalgen *Porphyra yezoensis*, *Galdieria sulphuraria* und *Cyanidioschyzon merolae* wurden im Rahmen dieser Arbeit GPI-Sequenzen etabliert, die eine N-terminale Extension enthalten.

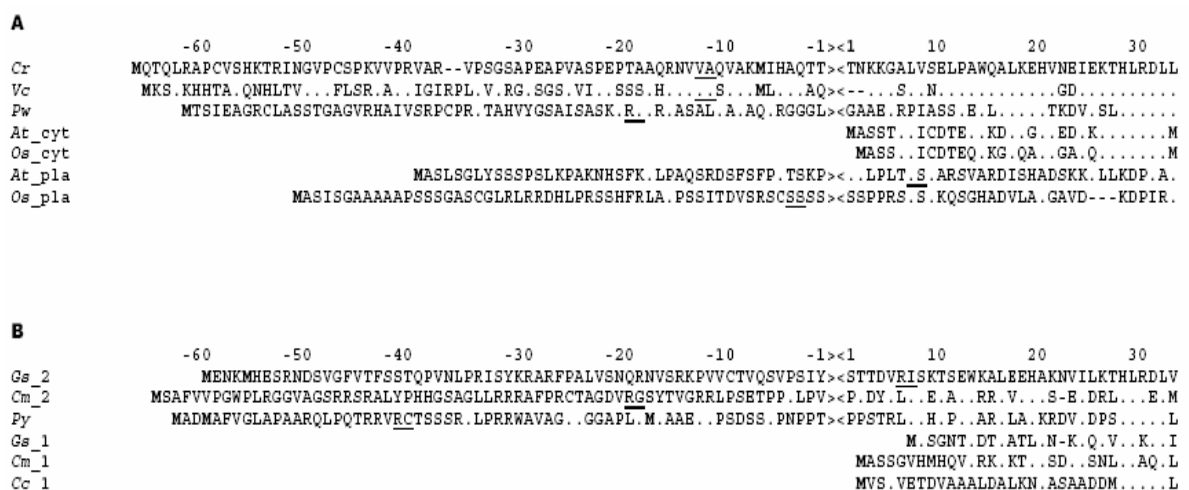


Abb. 15: Alignment des N-Terminus der GPI-Gene aus Streptophyten/Chlorophyten (A) und Rhodophyten (B). Die Nummerierung der AS entspricht der AS-Sequenz des Referenzproteins aus *Arabidopsis thaliana* (P34795). Methionine innerhalb der putativen Transit-Peptide sind fett dargestellt (M). Unterstrichene AS zeigen die mögliche Protease-Spaltstelle des Transit-Peptides wie von TargetP und ChloroP vorhergesagt. **Cr:** *Chlamydomonas reinhardtii*, **Vc:** *Volvox carteri f. nagariense*, **Pw:** *Prototheca wickerhamii*, **At:** *Arabidopsis thaliana*, **Os:** *Oryza sativa*, **Gs:** *Galdieria sulphuraria*, **Cm:** *Cyanidioschyzon merolae*, **Py:** *Porphyra yezoensis*, **Cc:** *Chondrus crispus*

Es ist unwahrscheinlich, dass diese Extensionen Artefakte der *in silico*-Analysen (wie z. B. ein nicht identifiziertes Intron) darstellen, denn bei der GPI aus *Porphyra* handelt es sich um einen cDNA-Klon, die Sequenz aus *Cyanidioschyzon* ist im Rahmen des Sequenzierungsprojektes annotiert worden, und die Sequenz aus *Chlamydomonas* wird durch EST-Daten bestätigt. Die GPI aus *Chlamydomonas* und *Volvox* beinhalten

innerhalb der N-terminalen Extension zwei Methionin-Reste in den Positionen -67 und -7 (*Chlamydomonas*) bzw. -66 und -7 (*Volvox*), aber der Vergleich mit der Sequenz aus der weiteren Grünalge *Prototheca*, die nur ein einziges Methionin enthält, legt nahe, dass es sich bei dem ersten Methionin um das Start-Codon handelt. Auch die Extensionen der Gene aus *Galdieria* und *Cyanidioschyzon* enthalten keine weiteren Methionin-Rest, was die Authentizität dieser Extensionen in den Rhodophyten unterstützt. Die Vorhersageprogramme TargetP (Emanuelsson *et al.* 2000) und ChloroP (Emanuelsson *et al.* 1999) klassifizieren diese Extensionen eindeutig als Transit-Peptide für den Import in Plastiden. Die jeweils putative Protease-Spaltstelle ist in Abbildung 15 dargestellt. Daher werden die entsprechenden GPIs im Folgenden als plastidäre GPI bezeichnet (GPIpla) (siehe auch Kap. 3.3.7). Sie gruppieren in der phylogenetischen Analyse der GPI-Sequenzen (Kap. 3.3.7) auf einem distinkten Ast zusammen mit den cytosolischen Sequenzen aller Plantae. Wahrscheinlich sind sie durch Duplikation des cytosolischen Gens und den anschließenden Erwerb eines Transit-Peptides entstanden.

Transit-Peptide zeichnen sich durch ein gehäuftes Vorkommen von basischen Aminosäuren aus, die AS-Sequenzen selbst jedoch sind zwischen verschiedenen Organismen in der Regel nicht konserviert. Die N-terminalen Extensionen der nahe verwandten Grünalgen *Chlamydomonas* und *Volvox* enthalten aber stark konservierte AS-Bereiche (Abb. 12), und auch in den Sequenzen der Rotalgen *Galdieria* und *Porphyra* sind AS-Motive konserviert. Darüber hinaus befindet sich in den genomischen Sequenzen von *Chlamydomonas* und *Volvox* ein konserviertes Intron in Position -(2-0) (Kap. 3.3.6), also unmittelbar vor dem Translationsstart in der cytosolischen Isoform der Landpflanzen. Beides deutet darauf hin, dass das Transit-Peptid der GPI möglicherweise in einem gemeinsamen Vorfahren durch "Exon shuffling" erworben wurde (vgl. Kilian *et al.* 2004).

3.3.6 Konservierte Introns in den Genen der cytosolischen und der plastidären GPI der Plantae

Die Positionen der Introns in den in dieser Arbeit etablierten genomischen Sequenzen aus den verschiedenen Vertretern der Plantae (Streptophyta/Chlorophyta, Rhodophyta und Glaucophyta) wurden bestimmt und miteinander verglichen. Darüber hinaus wurden anhand der cDNA-Sequenzen der GPIs aus dem primitiven Streptophyten *Mesostigma viride* (eine Sequenz) und der Rotalge *Chondrus crispus* (zwei rezent duplizierte Sequenzen) spezifische Primer konzipiert und unter Verwendung von genomischer DNA (von Jörn Petersen bzw. René Teich, beide TU Braunschweig, zur Verfügung gestellt) zur PCR-Amplifikation von genomischen Sequenzen der GPI-Gene eingesetzt, um die

3 Ergebnisse

Position etwaiger Introns auch in diesen Organismen bestimmen zu können. Allerdings sind in den Amplifikaten aller drei Gene keine Introns enthalten.

Eine Intron-Matrix mit allen in den GPI-Genen der in dieser Arbeit untersuchten Organismen identifizierten Introns ist in Abbildung 16 dargestellt. Die Nummerierung der Intron-Positionen bezieht sich auf die AS-Sequenz aus *Arabidopsis*. Auffällig ist die generelle Konservierung des gesamten Intron-Musters innerhalb der höheren Landpflanzen. In den GPI aus den Dikotyledonen *Arabidopsis thaliana* und *Clarkia xantiana*, den Monokotyledonen *Oryza sativa* (zwei Sequenzen) und *Sorghum bicolor* sowie dem Bärlappgewächs *Selaginella moellendorffii* (zwei Sequenzen) und der GPI-3 aus dem Moos *Physcomitrella patens* befinden sich im Allgemeinen 22 Introns an den in Abbildung 16 dargestellten konservierten Positionen. In *Arabidopsis* fehlt Intron 518-0, was aufgrund der Präsenz in allen anderen Landpflanzen auf einen sekundären Verlust zurückzuführen ist. Analog dazu ist in *Selaginella* (1) Intron 488-0 nicht mehr vorhanden. Bei den drei Sequenzen aus *Physcomitrella* handelt es sich um rezent duplizierte Gene (Daten nicht gezeigt), wobei die Gene GPI-1 und -2 keine Introns enthalten.

[illegible]

Abb. 16: Intron-Positionen in den GPI-Genen der verschiedenen Vertreter der Plantae. +: Intron in dieser Position; -: kein Intron in dieser Position; /: Sequenzbereich nicht existent. Zwischen den verschiedenen Abteilungen konservierte Positionen sind grau unterlegt. (cyt): cytosolisch. (pla): plastidär.

Auch in den GPI der Chlorophyten zeigt sich ein konserviertes Intron-Muster. Die Sequenz aus *Chlamydomonas* enthält 15 Introns, in *Volvox* sind 13 Introns vorhanden, hier fehlen die Introns in den Positionen 518-0 und 554-0. Diese Sequenzen tragen eine

N-terminale Transitsequenz und werden vermutlich in den Plastiden importiert (Kap. 3.3.5). Ihre distinkte Assoziation zur cytosolischen GPI der Streptophyta in der phylogenetischen Analyse (Kap. 3.3.7) legt einen Ursprung dieser Sequenzen aus einer Duplikation des cytosolischen Gens nahe. Obwohl Streptophyten und Chlorophyten einen gemeinsamen Ursprung haben, gibt es zwischen den Sequenzen aus den Landpflanzen und *Chlamydomonas* lediglich eine konservierte Intron-Position (554-0, s. Abb. 16).

Ebenfalls völlig unterschiedliche Verteilungsmuster der Intronpositionen zeigen sich in der cytosolischen und der plastidären Isoform der GPI aus der Rotalge *Galdieria sulphuraria*. Die cytosolische GPI-1 enthält zwei Introns an einzigartigen Positionen. In der plastidären GPI-2 sind elf Introns enthalten, wobei die Existenz der Introns in den Positionen 347-0 und 439-0 bemerkenswert ist. Diese Positionen sind einerseits auch in den GPI der Chlorophyta vorhanden, und darüber hinaus ist Position 439-0 ebenfalls in der GPI-1 des Glaucophyten *Cyanophora paradoxa* konserviert. An Position 439-0 ist folglich in allen drei Abteilungen der Plantae ein Intron vorhanden. Ein rein zufälliger unabhängiger Erwerb eines Introns in exakt derselben Position in allen drei Abteilungen ist höchst unwahrscheinlich. Möglicherweise war das Intron an Position 439-0 daher schon in der GPI eines gemeinsamen Vorfahren der Plantae vor der Aufspaltung in Glaucophyta, Chlorophyta und Rhodophyta vorhanden und wurde über einen Zeitraum von mehr als 1,5 Mrd. Jahren seit der Entstehung der photosynthetischen Eukaryoten (Hedges *et al.* 2004, Yoon *et al.* 2004) konstant weitervererbt. Die Abwesenheit dieses Introns in den Streptophyten lässt sich durch einen sekundären Verlust erklären.

3.3.7 Phylogenetische Analysen der etablierten Glucose-6-Phosphat Isomerasen

Die abgeleiteten AS-Sequenzen der in dieser Arbeit isolierten und sequenzierten sowie durch Internetrecherche *in silico* etablierten Glucose-6-Phosphat Isomerasen wurden phylogenetischen Analysen unterzogen. Die Erstellung der Alignments, die Berechnung der jeweils zwei Maximum Likelihood (ML, Treefinder bzw. Phylip) Topologien sowie der statistischen Unterstützung der internen Verzweigungen durch Bootstrap-Analysen erfolgte wie in Kapitel 2.12 beschrieben. Abbildung 17 zeigt eine Übersicht über einen umfassenden Treefinder ML-Baum basierend auf der Analyse von 179 GPI-Sequenzen.

3 Ergebnisse

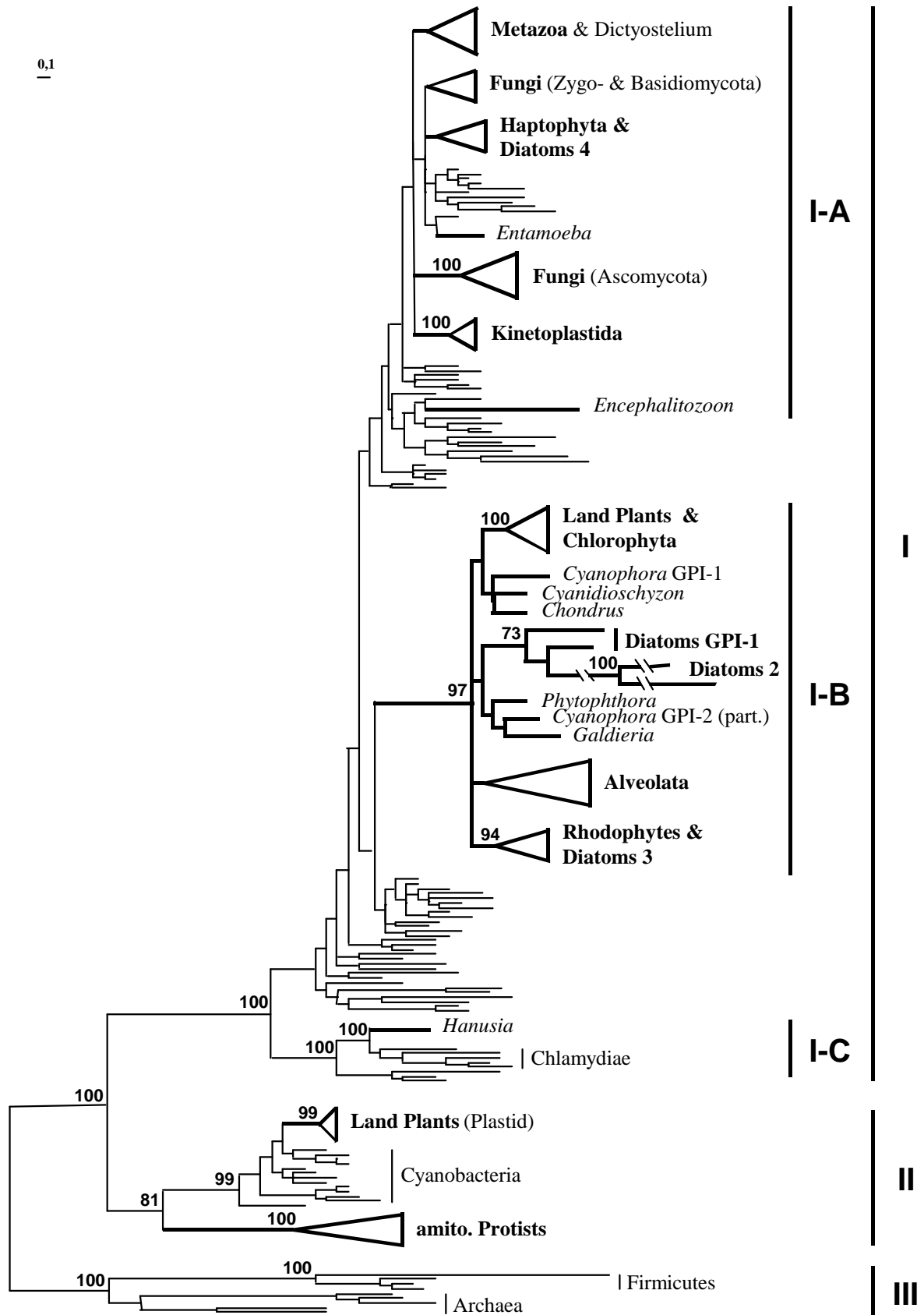


Abb. 17: Übersicht über die umfassende Treefinder Maximum Likelihood-Analyse von 179 GPI-Sequenzen. Statistische Unterstützung der jeweiligen Verzweigung in % BP.

3 Ergebnisse

Der Datensatz enthält 89 eubakterielle und 5 archaeale sowie 85 eukaryotische Sequenzen aus verschiedenen Linien inklusive der Plantae (Streptophyta/Chlorophyta, Rhodophyta und Glaucophyten), der Alveolata (Dinophyta, Apicomplexa, Ciliata und Perkinsea), der übrigen komplexen Algen mit roten Plastiden (Haptophyta, Diatomeen, Cryptophyta) sowie der Pilze (Fungi), Metazoa, verschiedener Protisten und amitochondrialer Eukaryoten.

Der Baum zeigt eine deutliche Aufspaltung in drei Äste, die entsprechend der Analysen von Nowitzki *et al.* (1998) im Folgenden als Gruppierung I, II und III bezeichnet werden. Die divergenteste Gruppierung III wurde als Außengruppe des Stammbaums verwendet. In ihr sind die homologen GPI der Archaea zusammen mit den Sequenzen der Firmicutes (vorwiegend gram-positive Eubakterien, zu denen die Bacillales, Lactobacillales, Clostridia und *Mycoplasma* gezählt werden) enthalten. Gruppierung II enthält die Sequenzen der plastidären GPI aus Landpflanzen und deren cyanobakterielle Verwandte sowie die basal davon abzweigende Gruppe der eng miteinander verwandten GPI aus amitochondrialen Protisten (Henze *et al.* 2001). Die distinkte Gruppierung I enthält die Mehrzahl der eubakteriellen und der eukaryotischen Sequenzen. Diese Gruppierung kann im Hinblick auf die Verteilung der Eukaryoten in die drei Sub-Gruppen I-A, I-B und I-C unterteilt werden.

Dabei auffällig ist die starke Assoziation zwischen dem Cryptophyten *Hanusia phi* und den Chlamydien in I-C, die mit einem Bootstrap-Wert von 100% unterstützt wird. Es kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei der im Rahmen dieser Arbeit etablierten *Hanusia*-Sequenz um eine bakterielle Kontaminante handelt, da aus dem sehr nahe verwandten Cryptophyten *Guillardia theta* ein fast identischer EST-Klon (übereinstimmend in 155 der 158 abgeleiteten AS) identifiziert wurde (S. Zauner, Marburg, unveröffentlicht). Eine weitere Auffälligkeit ist der außerordentlich lange gemeinsame Ast der Sub-Gruppe I-B, der aus einer Vielzahl eubakterieller Sequenzen entspringt, deren phylogenetische Stellung nicht aufgelöst ist. Er enthält GPI-Sequenzen der Plantae (Streptophyten/Chlorophyten, Rhodophyten und Glaucophyten), einen Ast mit Sequenzen aus den Alveolaten (Dinophyten, Apicomplexa, *Perkinsus* und Ciliaten) sowie Sequenzen aus Stramenopilen (Diatomeen und den Oomycet *Phytophthora*). Eine Subanalyse der Gruppierung I-B ohne die extrem divergenten Sequenzen der GPI-2 der Diatomeen sowie ohne die partielle cDNA-Sequenz aus dem Glaucophyten *Cyanophora* ist in Kapitel 3.3.7.1 (Abb. 19) dargestellt.

Die übrigen eukaryotischen Sequenzen der umfassenden Analyse in Abbildung 17 gehören zur Sub-Gruppe I-A, die ebenfalls aus den eubakteriellen Sequenzen entspringt, allerdings kaum aufgelöst wird. Auch die GPI aus den Haptophyten *Emiliania huxleyi* und *Pavlova lutheri* gehören in diese Subgruppe, sie bilden einen gemeinsamen Ast mit den

3 Ergebnisse

GPI-4 der Diatomeen *Phaeodactylum* und *Thalassiosira*. Eine Sub-Analyse dieser Gruppierung I-A nach Ausschluss stark divergenter Sequenzen, v. a. fast aller Ascomyceten, ist in Abbildung 18 dargestellt.

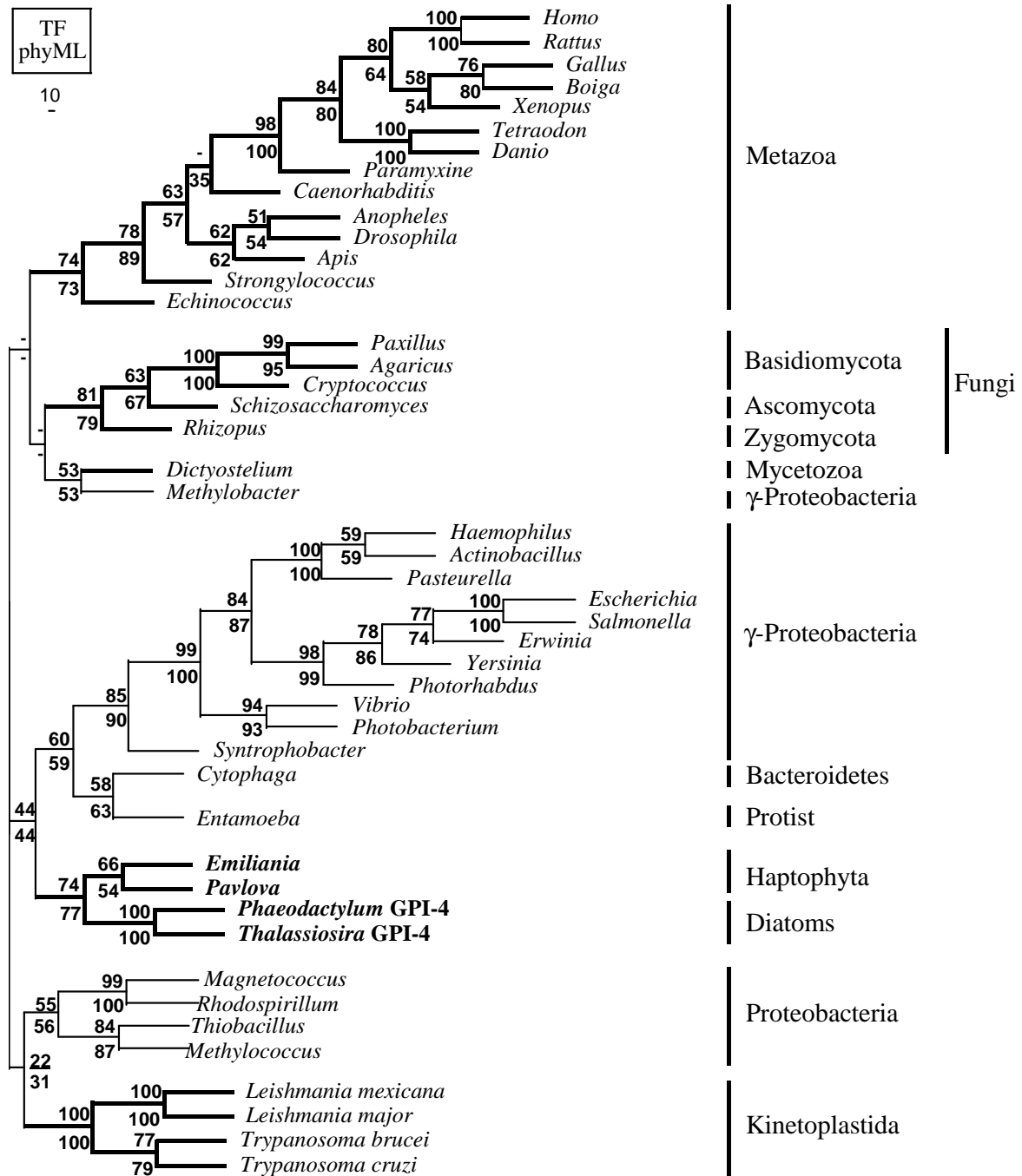


Abb. 18: Maximum Likelihood- Baum einer Sub-Analyse der GPI-Sequenzen aus Sub-Gruppe I-A. TF: Treefinder. phyML: Phylip Maximum Likelihood.

3 Ergebnisse

Auch diese GPI-Analyse lässt keine Aussagen über die Stellung des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* sowie des Protisten *Entamoeba proteus* innerhalb der Eukaryoten zu. Im Gegensatz zur der umfassenden Analyse aller Sequenzen unterstützt sie jedoch eine gemeinsame Gruppierung der Fungi mit solider statistischer Unterstützung (81/79% BP). Die Polyphylie der Fungi in Abbildung 17 ist möglicherweise auf die stark verlängerten Äste der Ascomyceten zurückzuführen, die das Resultat einer vergleichsweise sehr viel höheren Evolutionsrate der Sequenzen dieser Organismen sind. Derartige Ungleichheiten innerhalb des Datensatzes haben generell eine Verminderung der statistischen Unterstützung zur Folge und verursachen häufig eine falsche Positionierung der divergenten Sequenzen durch so genannte "long branch attraction" Effekte (LBA; Felsenstein 1978, Brinkmann *et al.* 2005). Vergleichbare Beobachtungen bezüglich der Sequenzen aus Ascomyceten wurden kürzlich für die cytosolische Fructose-1,6-Bisphosphatase (FBP) gemacht (Teich *et al.* 2006), was auf eine allgemein beschleunigte Evolutionsrate innerhalb dieser Gruppe der Fungi hindeutet, welche LBA-Probleme in der phylogenetischen Rekonstruktion der Evolution der Fungi verursacht.

3.3.7.1 Verbreitung und Ursprung der cytosolischen und der plastidären GPI der Plantae

Die plastidären GPI der Streptophyta gruppieren zusammen mit den Cyanobakterien innerhalb des distinkten Subastes I-C (Abb. 17), was ihren endosymbiotischen Ursprung belegt. Alle übrigen GPI-Sequenzen der Vertreter der Plantae gehören zur Gruppe I-B. Eine Subanalyse dieser Gruppierung ist in Abbildung 19 gezeigt. Die cytosolische GPI der Streptophyta sollte die Wirtszelle der primären Endosymbiose repräsentieren. Ihr gemeinsamer Ursprung mit der einzigen GPI der Chlorophyten wird in der phylogenetischen Analyse mit einer statistischen Unterstützung von 100% BP eindeutig belegt. Die Assoziation des Streptophyten *Mesostigma* mit den Chlorophyten ist statistisch nur gering unterstützt und lässt sich möglicherweise auf eine beschleunigte Evolutionsrate dieser Sequenz zurückführen (LBA). Der gemeinsame Ursprung der GPI aus Chlorophyten und Streptophyten ist von besonderem Interesse im Hinblick auf das Vorkommen des N-terminalen plastidären Transitpeptides in den Sequenzen der Chlorophyten (s. Kap 3.3.5), welches eine sekundäre subzelluläre Lokalisation dieser Proteine in den Chloroplasten nahe legt.

Auch die Rhodophyten besitzen eine plastidäre GPI mit einem N-terminalen Transit-Peptid, jedoch im Gegensatz zu den Chlorophyten zusätzlich noch eine cytosolische Isoform.

3 Ergebnisse

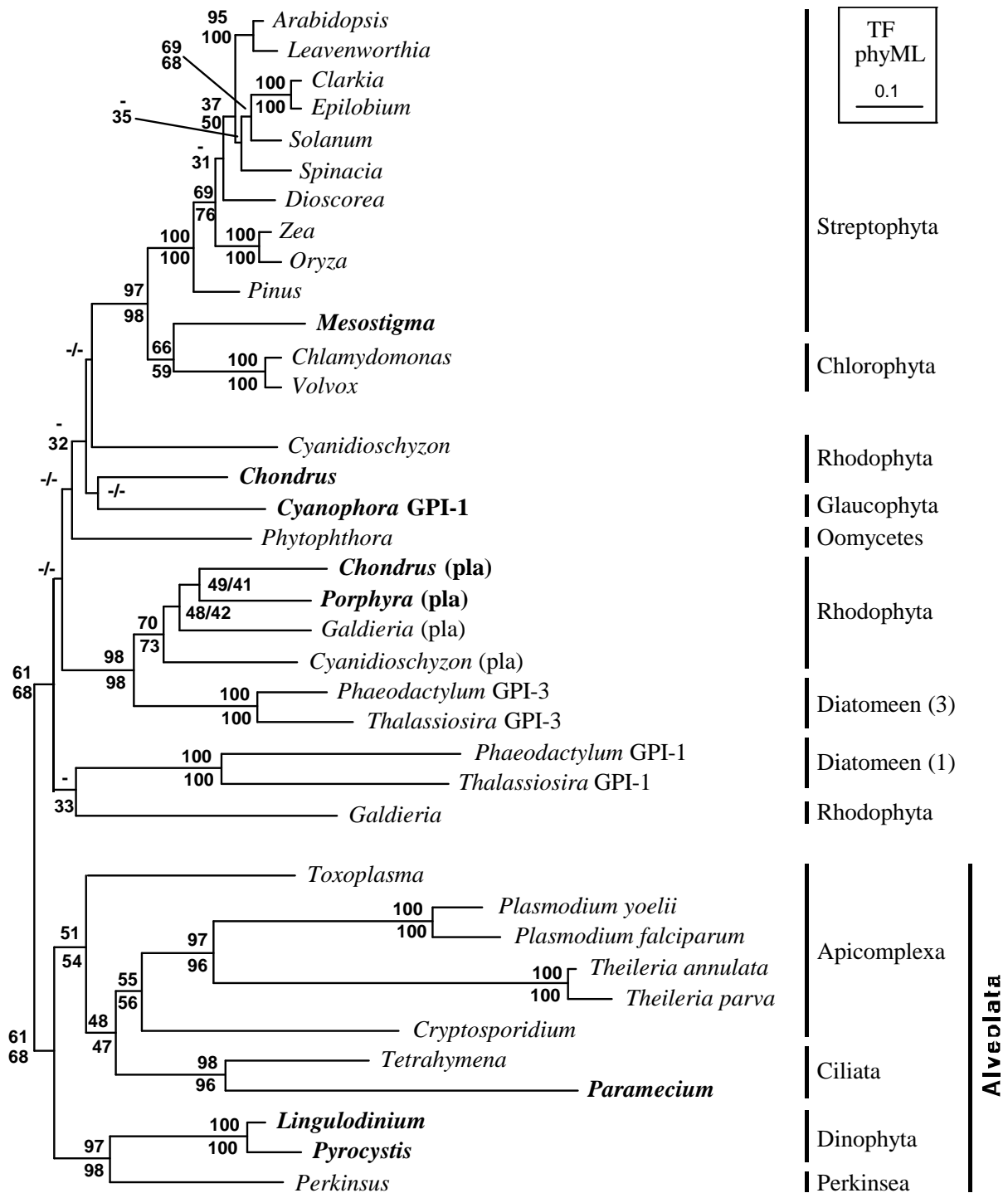


Abb. 19. Treefinder-Analyse der GPI-Sequenzen der Sub-Gruppe I-B, zu welcher bis auf die plastidären, endosymbiotisch erworbenen Sequenzen der Landpflanzen alle GPI der Plantae gehören. **TF:** Treefinder. **phyML:** Phylip Maximum Likelihood.

Die hier gezeigten Analysen legen die Schlussfolgerung nahe, dass Chlorophyten und Rhodophyten die aus der Wirtszelle stammende, ursprünglich cytosolisch lokalisierte GPI durch unabhängige Gen-Duplikation und den anschließenden Erwerb eines Transit-Peptids zu einem plastidären Protein umfunktioniert haben, wobei die cytosolische Isoform in den Chlorophyten anschließend verloren ging. Der lange Ast des plastidären Rotalgen-Zweiges spiegelt wahrscheinlich einen verminderten selektiven Druck auf diese Kopie des Genes unmittelbar nach der Duplikation wider, der anschließend an den Erwerb des Transit-Peptids und einer neuen Funktion innerhalb des Plastiden wieder hoch war. Vergleichbare Beobachtungen wurden kürzlich für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) in der frühen Evolution der Landpflanzen beschrieben (Petersen *et al.* 2006b). Auch die beiden 5'-partiellen Sequenzen aus dem Glaucophyten *Cyanophora* entsprechen möglicherweise ebenfalls einer cytosolischen und einer plastidären Isoform, womit auch in dieser dritten Gruppe der Plantae das plastidäre Enzym einer duplizierten Form der cytosolischen Isoform entsprechen könnte.

3.3.7.2 Verbreitung und Ursprung der GPI in den Alveolata und den "Chromista"

Die Analyse der Sub-Gruppierung I-B in Abbildung 19 kann die Verwandtschaftsbeziehungen der unterschiedlichen GPI-Gene aus den Plantae nicht auflösen. Sie legt jedoch mit einer moderaten statistischen Unterstützung von 57/68% BP eine Monophylie der Alveolata nahe, was mit der Annahme übereinstimmt, dass die cytosolische GPI die Wirtszelle repräsentiert. Innerhalb der Alveolaten bilden die Ciliaten *Tetrahymena thermophila* und *Paramecium tetraurelia* sowie die Dinophyten *Pyrocystis lunula* und *Lingulodinium polyedrum* jeweils distinkte Äste mit einer Unterstützung von 98/97% BP bzw. 100/100% BP. Die Monophylie der Apicomplexa wird nicht unterstützt, was sich mit den unterschiedlichen Evolutionsraten und daraus resultierenden möglichen LBA-Problemen innerhalb der Gruppe erklären lässt. Eine erhöhte Evolutionsrate in *Theileria* und *Plasmodium* lässt sich auch bei vielen anderen Genen beobachten (siehe auch Kap 3.8, MEP-Pathway). Sie scheint ein generelles Merkmal dieser Gattungen zu sein und führt in der hier vorliegenden Analyse zu einer Positionierung der Ciliaten innerhalb der Apicomplexa sowie zu einer nur schwachen Unterstützung des gesamten Alveolaten-Astes. Auch Dinophyta zeigen in den Analysen verschiedener Marker stark verlängerte Äste (Petersen *et al.* 2006a, Bachvaroff *et al.* 2006); die in dieser Arbeit analysierte GPI evolviert allerdings in einer mit den anderen Organismen vergleichbaren Geschwindigkeit. Daher scheint die enge Gruppierung der Dinophyten mit *Perkinsus*

3 Ergebnisse

marinus, welche mit Bootstrap-Werten von 91/93% BP statistisch stark unterstützt wird, die tatsächliche phylogenetische Beziehung wiederzuspiegeln (siehe auch Kap. 1.3).

Die distinkte Positionierung von *Hanusia* mit den Chlamydien in der Subgruppe I-C wird durch eine statistische Unterstützung von 100% BP eindeutig belegt und legt daher einen Cryptophyten-spezifischen Erwerb der GPI von einem chlamydialen Eubakterium durch horizontalen Gentransfer (HGT) nahe.

Die jeweils vier GPI-Sequenzen der Diatomeen sind in den beiden Sub-Ästen I-A (GPI-4) und I-B (GPI-1, -2, -3) vertreten. Die paarweise Gruppierung je einer Sequenz aus *Phaeodactylum* und *Thalassiosira* deutet darauf hin, dass bereits ein gemeinsamer Vorfahre dieser beiden Diatomeen über alle vier GPI verfügte. Diatomeen sind die einzigen Eukaryoten, die GPI-Sequenzen aus den beiden eukaryotischen Sub-Gruppierungen I-A und I-B besitzen. Die GPI-4 in I-A gruppiert zusammen mit den Sequenzen der Haptophyten, bei denen zumindest im Genom von *Emiliania* nur ein einziges GPI-Gen vorhanden ist (Kap. 3.3.3). Die schwache statistische Unterstützung dieser Gruppierung in der umfassenden Analyse steigt in der Subanalyse (Abb. 18) nach der Eliminierung der divergenten Sequenzen auf Werte von 74/77% BP und legt damit einen gemeinsamen Ursprung dieser Sequenzen nahe. In der Sub-Analyse der Gruppe I-B sind die Stramenopilen mit einer GPI aus *Phytophthora* sowie drei der vier Sequenzen aus den Diatomeen (GPI-1, -2 und -3) vertreten. Die enge Assoziation der GPI-3 der Diatomeen mit den plastidären Sequenzen der Rhodophyten legt einen gemeinsamen Ursprung dieser Gene nahe. Durch eine separate Analyse dieser Sequenzen ergibt sich darüber hinaus eine Positionierung der Diatomeen-Sequenzen innerhalb der GPIpla der Rotalgen (Daten nicht gezeigt), was darauf schließen lässt, dass Diatomeen dieses Gen im Kontext der sekundären Endosymbiose durch Gentransfer aus der rekrutierten Rotalge erworben haben. Die heutige Lokalisierung der GPI-3 in der Diatomeen-Zelle ist allerdings unbekannt. RT-PCR-Amplifikate des 5'-Bereiches der GPI-3 aus *Phaeodactylum* zeigen eine vergleichsweise lange N-terminale Extension von ca. 180 Aminosäuren, die auch das für die Lokalisation in den komplexen Plastiden notwendige Sequenzmotiv (A↓FVP, Kap. 1.4.1) enthält (Daten nicht gezeigt). Das Prediktionsprogramm SignalP postuliert die Existenz eines Signalpeptides am N-Terminus sowie die Position seiner Protease-Spaltstelle unmittelbar vor dem Phenylalanin (F) des Konsensus-Motivs (Daten nicht gezeigt), was der typischen Spaltstelle in plastidär lokalisierten Proteinen in Diatomeen entspricht (Kilian und Kroth 2005). Zellbiologische Lokalisationsversuche mittels eGFP-Reportergen-Konstrukten im Rahmen dieser Arbeit blieben jedoch ergebnislos (Daten nicht gezeigt).

Die GPI-2 der Diatomeen sind die divergentesten eukaryotischen Sequenzen der gesamten Analyse. Es handelt sich jedoch offensichtlich nicht um Pseudogene, wie die

3 Ergebnisse

Existenz einer EST-Sequenz aus *Phaeodactylum* (CD377263) belegt. Die GPI-2 ist möglicherweise durch eine frühe Duplikation aus der GPI-1 entstanden. Diese gruppiert in der vorliegenden Analyse innerhalb der cytosolischen Sequenzen der Rotalgen, ebenso wie die Sequenz aus *Phytophthora*. Ein gemeinsamer Ursprung dieser möglicherweise cytosolischen (laut der Prediktionsprogramme enthält die Sequenz keine Signal- bzw. Transitpeptide; Daten nicht gezeigt) Sequenz aus den Stramenopilen wird nicht aufgelöst. Die ausschließliche Präsenz einer mit den Plantae verwandten GPI (Abb. 17) in einer Vielzahl von *Phytophthora*-Spezies (Ospina-Giraldo und Jones 2003) legt nahe, dass es sich hierbei um das ursprüngliche Gen der Wirtszelle der primären Endosymbiose handelt. Diese Annahme steht im Einklang mit umfangreichen phylogenomischen Analysen, die auf Wirtszellebene eine enge Assoziation von Stramenopilen und Alveolaten belegen (Rodríguez-Ezpeleta *et al.* 2005).

3 Ergebnisse

3.4 Die Verbreitung der beiden IPP-Biosynthesewege in den Plantae

Während Streptophyta über den cytosolischen MVA- und den plastidären MEP-Pathway der IPP-Biosynthese verfügen, synthetisieren Chlorophyta Isoprenoide ausschließlich über den plastidären Weg (Kap. 1.6). Die durch neuere molekulare Analysen verifizierte Zugehörigkeit der Grünalge *Mesostigma viride* zu den Streptophyten (Kap. 1.6) gab im Rahmen dieser Arbeit Anlass, neben dem Vorkommen der cytosolischen und der plastidären Glucose-6-Phosphat Isomerase (GPI, Kap. 3.3.1) auch die Präsenz der beiden IPP-Biosynthesewege in diesem Organismus zu untersuchen. Darüber hinaus wurde die Verbreitung dieser Pathways in den übrigen Gruppen der Plantae, den Rhodophyta und Glaucophyta molekular untersucht.

3.4.1 *In silico* Etablierung der Gene für den MEP-Weg aus den Grünalgen *Chlamydomonas reinhardtii* und *Volvox carteri*

Die AS-Sequenz der DXS (pla-2) aus *Chlamydomonas reinhardtii* ist bereits in der Protein-Datenbank des NCBI annotiert. Durch BLAST-Suche in der JGI-Datenbank des Genomprojektes (<http://genome.jgi-psf.org/Chlre3/Chlre3.home.html>) konnten die Sequenzen für alle weiteren Gene des plastidären MEP-Wegs aus dieser Grünalge etabliert werden. Die Positionen der Introns und somit die kodierenden Sequenzen wurden, falls vorhanden, durch den Vergleich mit in der NCBI-Datenbank zugänglichen EST-Sequenzen, anderenfalls anhand der Homologie zu den jeweiligen AS-Alignments bestimmt. Unter Verwendung der Sequenzen aus *Chlamydomonas* wurden die genomischen Sequenzen aus *Volvox carteri* aus den TRACE-Files des NCBI assembliert und die Positionen der Introns anhand der Homologie zu *Chlamydomonas* bestimmt. Auch aus dieser Grünalge konnten alle Sequenzen der Gene des MEP-Wegs etabliert werden, wohingegen sowohl in *Chlamydomonas* als auch in *Volvox* keine Gene für den cytosolischen MVA-Weg vorhanden sind. Im Zuge der intensiven Datenbankrecherchen konnte ein Bereich von ca. 540 nt im Genom von *Chlamydomonas* in der Datenbank des JGI detektiert werden, der Homologie zu einem ca. 100 AS langen Teilbereich der HMGS (cyt-1) aufweist, was ca. 22% des vollständigen Enzyms aus *Arabidopsis* entspricht. Es sind im Genom von *Chlamydomonas* keine weiteren Sequenzinformationen für die HMGS enthalten. Möglicherweise handelt es sich bei dem hier identifizierten Bereich um ein Relikt eines vormals vollständigen HMGS-Gens.

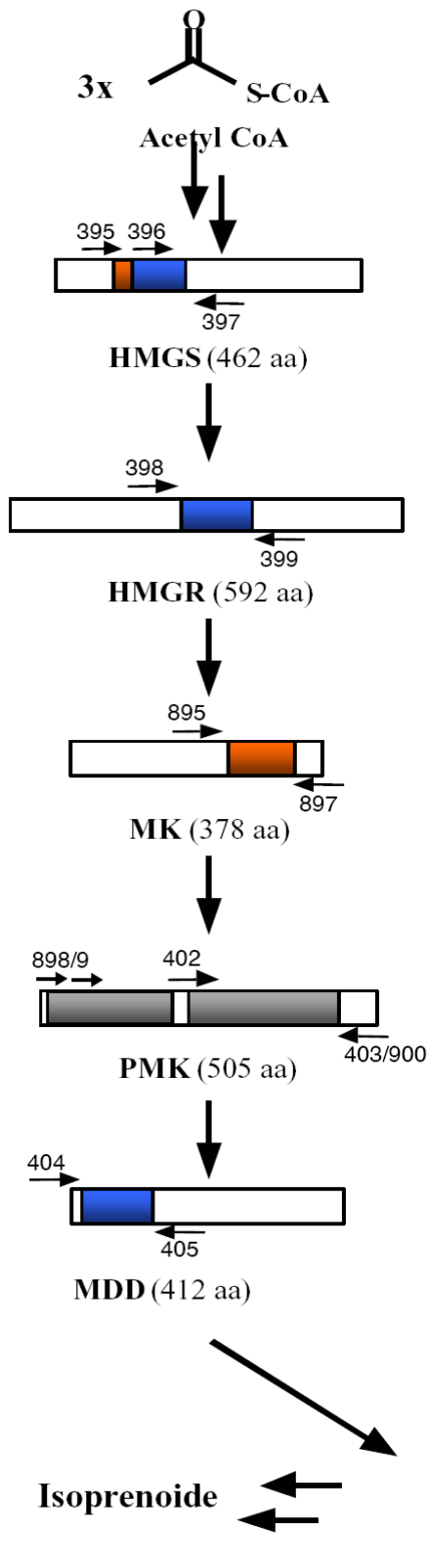
3.4.2 Isolierung und Sequenzierung zweier Klone für die HMGS aus *Chara vulgaris*

Aus der Charophyceae *Chara vulgaris* (Streptophyta) wurde in unserer Arbeitsgruppe durch RT-PCR-Amplifikation mit dem degenerierten Primerpaar P396(+)/P397(-) ein Fragment der HMGS (cyt-1) amplifiziert und zum homologen Screen einer λ -ZapII-cDNA-Bank eingesetzt (Diplomarbeit Caroline Machlitt, TU Braunschweig, 2006). Es konnten zwei unabhängige vollständige Klone der HMGS isoliert werden, die aus einer rezenten Duplikation des Gens hervorgegangen sind und sich geringfügig in einem "Indel" (Insertion/Deletion) von 8 Nukleotiden innerhalb der 3'-nicht-kodierenden Sequenz sowie in fünf Punktmutationen innerhalb der kodierenden Sequenz unterscheiden. Je eine dieser Mutationen führt zum Einbau von Valin bzw. Isoleucin, die anderen vier sind stumm. Die Sequenzen der Klone wurden in der Datenbank des NCBI hinterlegt (Acc. EF119238, EF119239) und der Klon HMGS-1 im Rahmen dieser Arbeit phylogenetisch analysiert (Kap. 3.7).

3.4.3 Vorkommen des MEP- und des MVA-Wegs in *Mesostigma viride* und *Cyanophora paradoxa*

Um die Existenz der beiden IPP-Biosynthesewege in dem primitiven Streptophyten *Mesostigma* und dem Glaucophyten *Cyanophora* zu untersuchen, sollten durch PCR-Amplifikation Gene für Enzyme des MVA- und des MEP-Pathways in diesen beiden Organismen nachgewiesen werden. Da zu Beginn der vorliegenden Arbeit keinerlei Sequenzinformationen über entsprechende Gene aus *Mesostigma* und *Cyanophora* vorlagen, wurden degenerierte Primer konzipiert (Kap. 2.8.2) und zur PCR-Amplifikation von Fragmenten der Gene des MVA- und des MEP-Pathways der IPP-Biosynthese eingesetzt. Unter Verwendung der im Anhang (Kap. 7.1) aufgeführten degenerierten Primer konnten durch RT-PCR mit poly(A)⁺-RNA (Kap. 2.8.4) aus *Mesostigma viride* sowie aus *Cyanophora paradoxa* Fragmente für die meisten Enzyme des MVA- und des MEP-Pathways amplifiziert werden. Die verwendeten degenerierten Primer, die relative Größe und die Position der Amplifikate innerhalb des jeweils vollständigen Gens sind in Abb. 20 dargestellt. Die Gesamtlänge der Aminosäuresequenz bezieht sich dabei auf die jeweilige Referenzsequenz aus *Arabidopsis thaliana* (Kap. 1.6). Die PCR-Amplifikationen wurden zweimal unabhängig voneinander unter Verwendung von verschiedenen RT-Ansätzen durchgeführt, um die Authentizität der Amplifikate zu überprüfen.

MVA-Pathway (Cytosol)



MEP-Pathway (Plastid)

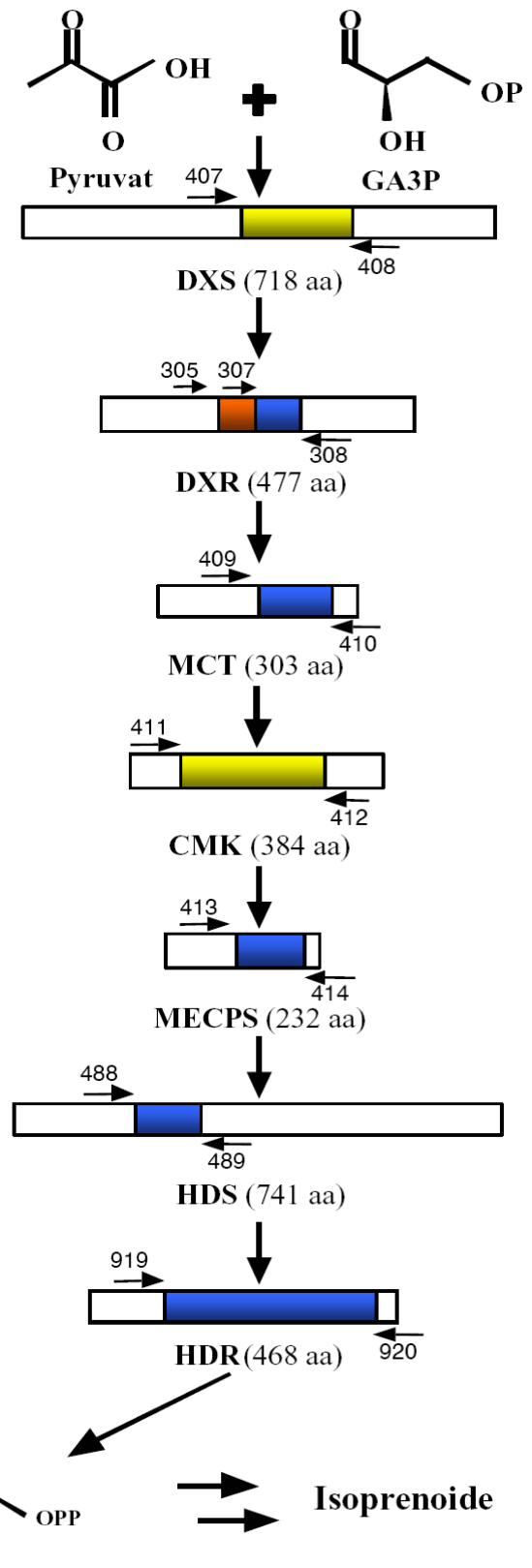


Abb. 20: PCR-Amplifikation von Genfragmenten für Enzyme des MVA- und MEP-Wegs aus *Mesostigma* und *Cyanophora*. (aa): Größe des Proteins aus *Arabidopsis* in Aminosäuren. Gelb: ausschließlich aus *Mesostigma* amplifiziert. Orange: ausschließlich aus *Cyanophora* amplifiziert. Blau: aus beiden Organismen amplifiziert. Graue Bereiche konnten nicht amplifiziert werden.

Darüber hinaus konnten im weiteren Verlauf der Arbeit durch Datenbank-Recherchen jeweils eine EST-Sequenz der HDR (pla-7) aus *Mesostigma* (DN255238) und aus *Cyanophora* (EC661319) in der NCBI-Datenbank identifiziert werden, die in den überlappenden Bereichen identisch mit den amplifizierten Fragmenten sind und deren Authentizität bestätigen.

Die Sequenzen der Amplifikate der Gene für den plastidären MEP-Weg aus *Cyanophora paradoxa* finden sich im Anhang (Kap. 7.5). Die Sequenzen der Amplifikate für Gene des cytosolischen MVA-Wegs aus *Cyanophora* sowie die Sequenzen der Amplifikate für beide Stoffwechselwege aus *Mesostigma viride* wurden in der Sequenzdatenbank des NCBI hinterlegt, ihre Acc. Nr. sind ebenfalls im Anhang aufgeführt (Kap. 7.3.2). Es war auch in wiederholten Versuchen mit verschiedenen Primerkombinationen und unter Verwendung unterschiedlicher poly(A)⁺-RNA-Isolate nicht möglich, ein Fragment der Mevalonat Kinase (MK, cyt-3) aus *Mesostigma* sowie der Phosphomevalonat Kinase (PMK, cyt-4) aus beiden Organismen zu amplifizieren, was wahrscheinlich auf die geringe Konservierung dieser beiden Proteine zurückzuführen ist. Die Existenz beider IPP-Biosynthesewege in *Mesostigma* wurde aufgrund von biochemischen Untersuchungen postuliert (Schwender *et al.* 2001), und durch die Amplifikation von Fragmenten fast aller Gene im Rahmen dieser Arbeit kann davon ausgegangen werden, dass beide Stoffwechselwege sowohl in *Mesostigma viride* als auch in *Cyanophora paradoxa* präsent sind.

3.4.4 Amplifikation einer fast vollständigen HMGS aus *Mesostigma viride* durch Kombination von degenerierten und genspezifischen Primern

Die Existenz des cytosolischen MVA-Pathways in dem primitiven Streptophyten *Mesostigma viride* konnte durch die Amplifikation von Fragmenten für drei der fünf Gene dieses Stoffwechselwegs gezeigt werden (Abb. 20, Kap. 3.4.3). Um die phylogenetische Stellung von *Mesostigma* im Bezug zu den anderen Vertretern der Plantae untersuchen zu können, sollte eine möglichst vollständige Sequenz der HMGS (cyt-1) aus *Mesostigma* etabliert werden. Da keine Genbibliothek zur Verfügung stand und aufgrund der geringen Menge an DNA-Material auch nicht hergestellt werden konnte, sollte die erfolgreiche RT-PCR-Strategie mit degenerierten Primer auch zur Amplifikation der noch fehlenden Teile der HMGS genutzt werden.

Ausgehend von dem mit dem degenerierten Primerpaar P395(+)/P397(-) erhaltenen Fragment (Kap. 3.4.3) wurden jeweils in 5'- und in 3'- Richtung weitere Bereiche des Genes amplifiziert. Dazu diente der nun bekannte Sequenzbereich zur Konzeption von zwei genspezifischen Primer, die jeweils mit einem weiteren, weiter in 5'- bzw. 3'-

3 Ergebnisse

Richtung gelegenen degenerierten Primer zur Amplifikation eines neuen Bereiches eingesetzt wurden. Die vollständige PCR-Strategie sowie die Größe der Amplifikate und ihre relative Lage innerhalb des Referenz-Proteins aus *Arabidopsis thaliana* sind in Abbildung 21 dargestellt.

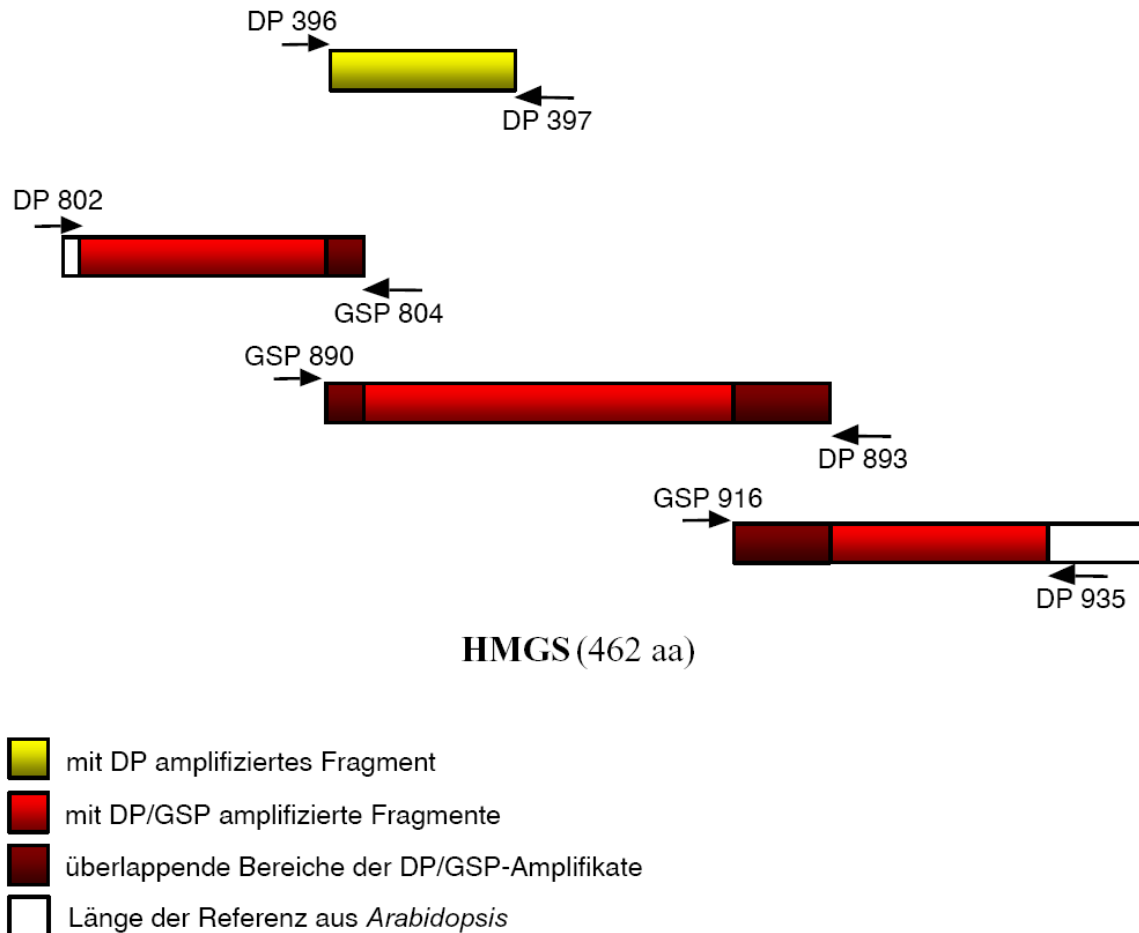


Abb. 21: Sukzessive Amplifikation der fast vollständigen HMGS aus *Mesostigma viride* durch RT-PCR mit degenerierten und genspezifischen Primern. (aa): Größe des Proteins aus *Arabidopsis* in Aminosäuren. DP: degenerierter Primer. GSP: Genspezifischer Primer

Die Amplifikation des fehlenden 5'-Bereiches erfolgte durch einen einzigen Amplifikationsschritt mit den Primern P802(+) und P804(-), während der 3'-Bereich in zwei Schritten mit jeweils neuen Primerpaaren (P890(+)/P893(-) und P916(+)/P935(-)) amplifiziert wurde. Die Sequenzen der eingesetzten degenerierten und genspezifischen Primer sind im Anhang aufgeführt (Kap. 7.1 bzw. Kap. 7.2). Es konnte durch diese Strategie die fast vollständige Sequenz der HMGS aus *Mesostigma* (88% der als

Referenz genutzten Sequenz aus *Arabidopsis*) amplifiziert werden. Die phylogenetische Analyse der abgeleiteten AS-Sequenz findet sich in Kapitel 3.7.1.

3.4.5 *In silico* Etablierung von Sequenzen des MEP- und des MVA-Wegs aus den Rotalgen *Cyanidioschyzon merolae* und *Galdieria sulphuraria*

Die Datenbanken der Genomprojekte für die Rhodophyten *Cyanidioschyzon merolae* und *Galdieria sulphuraria* wurden durch Stichwort-Suche bzw. unter Verwendung der BLAST-Funktion nach Genen aus den beiden IPP-Biosynthesewegen durchsucht (Kap. 3.1). Aus *Cyanidioschyzon* konnten die annotierten Sequenzen für alle sieben Gene des plastidären MEP-Wegs sowie eine Sequenz für die HMGS, das erste Enzym des cytosolischen Wegs, etabliert werden. Die weiteren Enzyme des cytosolischen Wegs sind im Genom dieser Rotalge nicht vorhanden. Aus *Galdieria* wurden die genomischen Sequenzen für alle sieben Gene des plastidären und alle fünf Gene des cytosolischen Wegs etabliert. Vorhandene Introns wurden durch den Vergleich mit ebenfalls in der Datenbank verfügbaren EST-Sequenzen bzw. anhand des jeweiligen Aminosäure-Alignments bestimmt.

3.4.6 Identifizierung und Sequenzierung von Genen des MEP-Wegs aus der Rotalge *Porphyra yezoensis*

Analog zu einem vollständigen GPI-Klon (Grauvogel 2003) aus *Porphyra yezoensis* wurden im Rahmen dieser Arbeit durch Datenbankrecherchen Klone für den plastidären MEP-Weg aus dem EST-Projekt dieser Rotalge identifiziert. Auch diese wurden freundlicherweise vom Kazusa Institut, Japan, zur Verfügung gestellt und von mir sequenziert. Es konnten vollständige Klone einer DXS (pla-1, AU190953), einer DXR (pla-2, AU196956), einer HDR (pla-7, AV429799) sowie ein partieller Klon einer HDS (pla-6, AU195150) etabliert werden. Die vollständigen Sequenzen dieser Klone wurden in der Datenbank des NCBI hinterlegt, ihre Acc. Nr. finden sich im Anhang (Kap. 7.3.2). In den zurzeit ca. 21.000 vorhandenen EST-Sequenzen aus *Porphyra* finden sich keine Gene für Enzyme des cytosolischen MVA-Wegs.

3.4.7 Zusammenfassung der Verbreitung von MVA- und MEP-Weg in den Plantae

Die Verbreitung der beiden IPP-Biosynthesewege in den verschiedenen in dieser Arbeit untersuchten Vertretern der Plantae ist zur Übersicht in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tab. 5: Verbreitung von MVA- und MEP-Weg in den in dieser Arbeit untersuchten Vertretern der Plantae

Taxon	Organismus	MVA (cyt)	MEP (pla)
Streptophyta	<i>Arabidopsis thaliana</i>	+	+
	<i>Oryza sativa</i>	+	+
	<i>Mesostigma viride</i>	+	+
	<i>Chara vulgaris</i>	HMGS	?
Chlorophyta	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	-	+
	<i>Volvox carteri</i>	-	+
Rhodophyta	<i>Galdieria sulphuraria</i>	+	+
	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	HMGS	+
	<i>Porphyra yezoensis</i>	?	+
Glaucophyta	<i>Cyanophora paradoxa</i>	+	+

Streptophyten synthetisieren IPP über den cytosolischen MVA- sowie den plastidären MEP-Weg. Im Gegensatz dazu ist der MVA-Weg in Chlorophyten nicht vorhanden.

Aus der Charophyceae *Chara vulgaris* konnten zwei rezent duplizierte HMGS (cyt-1)-Sequenzen etabliert werden. In dem primitiven Streptophyten *Mesostigma viride* und in dem Glaucophyten *Cyanophora paradoxa* sind sowohl der cytosolische MVA- als auch der plastidäre MEP-Weg vorhanden. Auch die Rotalge *Galdieria sulphuraria* verfügt über beide Wege. Aufgrund des gemeinsamen phylogenetischen Ursprungs der Plantae und die Präsenz beider Wege in Streptophyten, Rhodophyten und Glaucophyten ist daher die Abwesenheit des cytosolischen MVA-Wegs in Chlorophyten auf einen sekundären Verlust innerhalb dieser Gruppe zurückzuführen. Das im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene Fragment eines HMGS-Gens im Genom von *Chlamydomonas* repräsentiert möglicherweise ein Relikt des cytosolischen Wegs in diesem Organismus.

3.5 Die Verbreitung der beiden IPP-Biosynthesewege in den Alveolata und "Chromista"

Bisher gibt es keine Studien über die Verbreitung der Gene für Enzyme des cytosolischen MVA- und des plastidären MEP-Wegs der IPP-Biosynthese in den verschiedenen Gruppen der komplexen Algen mit roten Plastiden (Kap. 1.3). Apicomplexa, zu denen der Malariaerreger *Plasmodium falciparum* gehört, verfügen lediglich über den MEP-Weg. Sie werden aufgrund von wirtszellmarker-spezifischen Analysen der Gruppe der Alveolata zugeordnet, die Abstammung ihres nicht-photosynthetischen Apicoplasten von einer Rot- oder einer Grünalge ist allerdings nicht abschließend geklärt (Kap. 1.3). Über die Existenz der beiden IPP-Biosynthesewege in dem Alveolaten *Perkinsus marinus* war zu Beginn dieser Arbeit nichts bekannt; die Präsenz von drei der sieben Gene des plastidären MEP-Wegs in diesem Organismus wurde kürzlich gezeigt (Stelter *et al.* 2006). Über die Existenz des MVA- und des MEP-Wegs in den ebenfalls zu den Alveolata zählenden Dinophyta und Ciliata ist bisher nichts bekannt. Die Verbreitung der beiden IPP-Wege in den verschiedenen Gruppen der "Chromista" (Haptophyta, Stramenopile und Cryptophyta) wurde bisher nicht untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gene für die Enzyme der IPP-Biosynthese aus allen Abteilungen der Alveolata und "Chromista" etabliert, die Verbreitung der beiden Stoffwechselwege wurde untersucht und die phylogenetischen Beziehungen der jeweils daran beteiligten Gene analysiert.

3.5.1 *In silico* Etablierung von Sequenzen des MEP-Wegs aus den Apicomplexa

Durch Datenbank-Recherchen konnten im Rahmen dieser Arbeit Sequenzen für die Gene des plastidären MEP-Pathways aus verschiedenen Vertretern der Apicomplexa identifiziert werden. Sequenzen aus verschiedenen *Plasmodium*-Arten wurden durch BLAST-Suche in der Protein-Datenbank des NCBI etabliert. Im Verlauf dieser Arbeit wurden die Sequenzdaten der Sequenzierungsprojekte für *Theileria annulata* und *Theileria parva* publiziert (Pain *et al.* 2005, Gardner *et al.* 2005), und die annotierten AS-Sequenzen der am MEP-Weg beteiligten Enzyme sind inzwischen ebenfalls in der NCBI-Datenbank hinterlegt. Genomische Sequenzen aus *Babesia bigemina* wurden in dieser Arbeit durch die BLAST-Option des Genomprojektes des Sanger Institute, UK, etabliert und die Intron-Positionen durch Vergleich mit den Sequenzen aus den übrigen Apicomplexa bestimmt. Mit Ausnahme des aplastidären Apicomplexen *Cryptosporidium* enthalten alle sequenzierten Genome der verschiedenen Apicomplexa die Gene für die

Enzyme des plastidären MEP-Wegs, dagegen sind in keinem dieser Organismen Gene für den cytosolischen MVA-Weg vorhanden.

3.5.2 *In silico* Etablierung von Sequenzen des MVA-Wegs aus den Ciliaten *Paramecium tetraurelia* und *Tetrahymena thermophila*

Die Rohdaten der Genomsequenzierungs-Projekte für die Ciliaten *Paramecium tetraurelia* und *Tetrahymena thermophila* stehen in der NCBI-Datenbank für die MEGABLAST-Funktion zur Verfügung und wurden in dieser Arbeit unter Verwendung bekannter Nukleotid-Sequenzen aus verschiedenen tierischen und pflanzlichen Organismen nach den Genen für die beiden IPP-Biosynthesewege durchsucht. Es konnten weder aus *Tetrahymena* noch aus *Paramecium* Sequenzen mit Homologien zu Genen für den plastidären MEP-Weg identifiziert werden, was mit der kürzlich veröffentlichten Analyse der Sequenz des makronukleären Genoms von *Tetrahymena* übereinstimmt, in dem keinerlei Gene für ursprünglich cyanobakterielle/plastidäre Proteine gefunden wurden (Eisen *et al.* 2006). Hingegen wurden in der hier vorliegenden Arbeit aus den genomischen Sequenzen aus *Tetrahymena* alle fünf Gene des cytosolischen MVA-Pathways, aus den genomischen Sequenz-Rohdaten von *Paramecium* die Sequenzen für drei der fünf Gene des cytosolischen MVA-Wegs (HMGR, MK, MDD) etabliert. Die exakten Positionen der Introns und damit die kodierende Sequenz wurden anhand der Homologie zur jeweiligen AS-Sequenz aus *Tetrahymena* und anhand der Alignments bestimmt. Die abgeleiteten AS-Sequenzen wurden phylogenetisch analysiert (Kap. 3.7).

3.5.3 Isolierung und Sequenzierung des Gens für die DXR aus dem Dinophyten *Pyrocystis lunula*

Zur näheren Bestimmung der phylogenetischen Beziehungen der MEP-Gene aus den Dinophyten sollte exemplarisch eine vollständige Sequenz der DXR (pla-2) aus *Pyrocystis lunula* isoliert und identifiziert werden. Dazu wurde durch Massenexzision einer λ -ZapII-cDNA-Bank (freundlicherweise von W. Hastings, Harvard University, Cambridge, USA zur Verfügung gestellt) cDNA isoliert und diese als Matrize in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Mit dem degenerierten Primerpaar P307(+)/P308(-) (Kap. 7.1) wurde ein Fragment der DXR amplifiziert, zur Verifizierung sequenziert und als radioaktiv (α -³²P-dCTP) markierte Sonde zum homologen Screenen dieser λ -ZapII-cDNA-Bank eingesetzt. Aus der Bank konnte ein vollständiger cDNA-Klon der DXR isoliert werden, der anschließend

sequenziert wurde. Die cDNA-Sequenz dieses Klons wurde in der Datenbank des NCBI hinterlegt (Acc. DQ863278).

3.5.4 *In silico* Etablierung von Sequenzen des MEP-Wegs aus Dinophyten

Die cDNA-Sequenzen der "expressed sequence tag" (EST)-Projekte verschiedener Dinophyten sind teilweise in der EST-Datenbank des NCBI öffentlich zugänglich. Durch intensive Datenbankrecherchen konnten im Rahmen dieser Arbeit EST-Sequenzen für verschiedene Enzyme des plastidären MEP-Wegs aus den Peridinin-haltigen Dinophyten *Alexandrium tamarense*, *Amphidinium carterae*, *Heterocapsa triquetra* und aus dem Fucoxanthin-haltigen Dinophyten *Karlodinium micrum* identifiziert werden, sie sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tab. 6: Durch Datenbank-Recherche identifizierte EST-Sequenzen von Genen für den plastidären MEP-Weg aus Dinophyten. **P:** Peridinin-haltig, **F:** Fucoxanthin-haltig.

Dinophyt	Gen	Acc. Nr. der Sequenz
<i>Alexandrium tamarense</i> (P)	DXR (pla-2)	CK785267
	MCT (pla-3)	CK432493 CK432935 CK433669
	MECPS (pla-5)	CF774608
<i>Amphidinium carterae</i> (P)	MCT (pla-3)	CF067597
	HDS (pla-6)	CF065608
<i>Heterocapsa triquetra</i> (P)	DXS (pla-2)	DT381838 DT383372
<i>Karlodinium micrum</i> (F)	CMK (pla-4)	EC160532

Des Weiteren ist aus dem EST-Projekt für *Heterocapsa triquetra* von TBestDB (<http://tbestdb.bcm.umontreal.ca/searches/login.php>) eine partielle Protein-Sequenz der DXS (pla-2, AAW79337) verfügbar, die den Bereich von AS 350-720(Stop) umfasst. Sie wurde in der phylogenetischen Analyse der DXS (Kap. 3.8) untersucht.

Es konnten weder in der NCBI-Datenbank noch in den Datenbanken der EST-Projekte (TBestDB, <http://tbestdb.bcm.umontreal.ca/searches/login.php>) Sequenzen für Gene des cytosolischen MVA-Weg in den Peridinin-haltigen Dinophyten identifiziert werden.

3.5.5 *In silico* Identifizierung des plastidären MEP-Wegs in dem Alveolaten *Perkinsus marinus*

Perkinsus marinus wird aufgrund seiner Ultrastruktur zu den Alveolaten gezählt (Kap. 1.3). Aufgrund seiner wirtschaftlichen Bedeutung und evolutiven Schlüsselstellung wird dieser Protist zurzeit von "TIGR" (The Institute for Genomic Research, USA) vollständig sequenziert. Die vorläufigen assemblierten Sequenzen stehen in der TIGR-Datenbank für BLAST-Suchen zur Verfügung (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/pmg/>). Sie wurden im Rahmen dieser Arbeit nach Genen für Enzyme der beiden IPP-Biosynthesewege durchsucht. Es wurden dabei keine Sequenzen für Gene des cytosolischen MVA-Wegs gefunden. Allerdings konnten partielle Sequenzen von sechs der sieben Gene des plastidären MEP-Wegs (DXS, DXR, CMK, MECPS, HDS, HDR) identifiziert werden. Die Bezeichnungen der entsprechenden vorläufigen "contigs" sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die Intron-Positionen und somit die kodierende Sequenz wurden anhand der jeweiligen AS-Alignments bestimmt.

Tab. 7: partiell identifizierte Gene des MEP-Wegs aus den vorläufigen genomischen TIGR-Sequenzen von *Perkinsus marinus*. Die Nummerierung der AS-Bereiche und Größen in Klammern entsprechen der jeweiligen Referenzsequenz aus *Arabidopsis* (**A.t.**).

Gen	Contig	AS-Bereich (vgl. mit A.t.)
DXS (pla-1)	1099751635586	224-525 (718)
DXR (pla-2)	16110	118-430 (480)
CMK (pla-3)	3864	76-Stop (372)
MECPS (pla-5)	3891	75-Stop (232)
HDS (pla-6)	9486	66-207, 552-Stop (741)
HDR (pla-7)	10291	319-447 (468)

Da der MEP-Pathway in allen bisher untersuchten Eukaryoten ausschließlich plastidär lokalisiert ist, liefern diese Gene in *Perkinsus* ein sehr starkes Indiz für die Präsenz eines bisher unbekannten Plastiden. Dies ist im Einklang mit der erst sehr kürzlich veröffentlichten Entdeckung des pflanzentypischen Ferredoxin (ptFD) und der Ferredoxin-NADP⁺ Reductase (ptFNR) sowie pharmakologischen Inhibitor-Studien, die die Präsenz eines Plastiden in *Perkinsus* nahe legen (Stelter *et al.* 2006). Die partielle Sequenz der DXR (pla-2) wurde phylogenetisch analysiert (Kap. 3.8)

3.5.6 *In silico* Etablierung von Sequenzen des MVA- und des MEP-Wegs aus den Stramenopilen *Phaeodactylum tricornutum* und *Thalassiosira pseudonana* (Diatomeen) sowie *Phytophthora ramorum* und *Phytophthora sojae* (Oomyceten)

Die Sequenzen aus dem Genom-Sequenzierungsprojekt für die Diatomee *Thalassiosira pseudonana* waren zu Beginn dieser Arbeit noch als Rohdaten in der Datenbank des JGI hinterlegt und standen zur BLAST-Suche zur Verfügung. Inzwischen sind bereits annotierte AS-Sequenzen durch Stichwort-Suche in der JGI-Datenbank verfügbar. Im Rahmen dieser Arbeit konnten durch BLAST- sowie Stichwort-Suche alle Sequenzen des cytosolischen MVA-Wegs (fünf Gene) sowie des plastidären MEP-Wegs (sieben Gene) aus *Thalassiosira* identifiziert werden.

Die Rohdaten der Genom-Sequenzierungsprojekte für die Diatomeen *Phaeodactylum tricornutum* sowie für die heterotrophen Oomyceten *Phytophthora ramorum* und *Phytophthora sojae* sind in der NCBI-Datenbank durch die MEGABLAST-Funktion identifizierbar. Unter Verwendung der Nukleotid-Sequenzen aus *Thalassiosira* konnten aus den genomischen Rohdaten Homologe für drei der fünf Gene des MVA-Wegs (HMGS, HMGR, MDD) sowie alle sieben Gene des plastidären Wegs aus *Phaeodactylum* assembliert werden. Für die *Phytophthora*-Spezies wurden jeweils drei der Gene des MVA-Wegs (HMGS, MK, MDD) identifiziert. In diesen Oomyceten konnten keine Gene des plastidären MEP-Wegs identifiziert werden. Die etablierten AS-Sequenzen wurden phylogenetisch analysiert (Kap. 3.7, Kap. 3.8)

3.5.7 Isolierung und Sequenzierung einer vollständigen HMGR aus *Phaeodactylum tricornutum*

Unter Verwendung des etablierten Transformations-Systems für die Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* (Kap. 2.11) sollte im Rahmen dieser Arbeit die Lokalisation des in Landpflanzen cytosolischen MVA-Wegs in dieser Alge am Beispiel der HMGR (cyt-2) analysiert werden. Um die Expression dieses Gens zu belegen und die codierende Sequenz präzise zu bestimmen, sollte ein cDNA-Klon aus *Phaeodactylum* isoliert werden. Dazu wurde zunächst mit dem degenerierten Primerpaar P398(+)/399(-) (Kap. 7.1) durch RT-PCR unter Verwendung von poly(A)⁺-RNA (Kap. 2.7.5) ein Genfragment der HMGR aus *Phaeodactylum* amplifiziert. Dieses diente als homologe Sonde für das Screenen (Kap. 2.9) einer λZapII-cDNA-Bank, die freundlicherweise von Marie Françoise Liaud (TU Braunschweig) zur Verfügung gestellt wurde. Es konnte ein vollständiger cDNA-Klon der

HMGR isoliert werden, der anschließend doppelsträngig sequenziert wurde. Der Klon hat eine abgeleitete AS-Sequenz von 637 AS Länge. Er wurde zur phylogenetischen Analyse (Kap. 3.7) sowie zur Herstellung eines Reporter-gen-Konstrukts zum Nachweis der subzellulären Lokalisation der HMGR (Kap. 3.6) eingesetzt.

3.5.8 Etablierung von Sequenzen des MEP-Wegs aus Cryptophyten

In der hier vorliegenden Arbeit wurde aus cDNA des Cryptophyten *Hanusia phi* (bisher: *Cryptomonas phi*) durch PCR mit dem degenerierten Primerpaar 307(+)/308(-) (Kap. 7.1) ein Fragment des Gens für die DXR (pla-2) amplifiziert. Dieses wurde sequenziert und analog zur Isolierung einer GPI (Kap. 3.3.2) als homologe Sonde zum Screenen einer NM1149-cDNA-Bank eingesetzt. Es wurde eine vollständige Sequenz der DXR isoliert, anschließend sequenziert und phylogenetisch analysiert (Kap. 8). Die Sequenz dieses cDNA-Klons wurde in der NCBI-Datenbank hinterlegt (Acc. DQ863279).

Darüber hinaus wurde eine partielle Sequenz für die HDR (pla-7) aus dem Cryptophyten *Guillardia theta* mit der Acc. Nr. CAH25335 aus der Protein-Datenbank des NCBI etabliert. Sie besteht aus 330 AS und enthält damit ca. 71% des vollständigen Proteins (verglichen mit dem Homolog aus *Arabidopsis*).

Es war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich, Untersuchungen über das Vorkommen von Genen für den cytosolischen MVA-Weg in Cryptophyten durchzuführen.

3.5.9 Etablierung von Sequenzen des MVA- und des MEP-Wegs aus den Haptophyten *Prymnesium parvum* und *Pavlova lutheri*

Die im Rahmen der EST-Projekte für die Haptophyten *Prymnesium parvum* und *Pavlova lutheri* etablierten Sequenzdaten sind teilweise in den Datenbanken der entsprechenden Projekte (Kap. 3.1) sowie inzwischen auch in der EST-Datenbank des NCBI öffentlich zugänglich. Im Rahmen dieser Arbeit konnten durch Datenbank-Recherchen eine partielle HMGS (cyt-1, DV100981) sowie eine partielle DXR (pla-2, DV098488) aus *Prymnesium*, eine partielle DXS (pla-1) aus *Pavlova* (AY826876) sowie jeweils eine partielle HDR (pla-7) aus beiden Organismen (*Prymnesium*: DV103031; *Pavlova*: EC172639 und EC175503) etabliert werden. Anhand dieser Sequenzinformationen wurden genspezifische Primer für die DXR und die DXS konzipiert (Kap. 7.2), mit denen jeweils ein Sondenfragment zum homologen Screenen von genomischen Banken amplifiziert wurde. Die dabei verwendeten RT-Reaktionen sowie die genomischen Genbanken wurde freundlicherweise

von René Teich, TU Braunschweig, zur Verfügung gestellt (Diplomarbeit René Teich 2002). Der unter Verwendung der DXS-Sonde aus der genomischen EMBL3-Bank von *Pavlova* isolierte Klon stellte sich nach phylogenetischer Analyse als eine bakterielle Kontaminante heraus. Mit der DXR-Sonde konnte aus *Prymnesium* ein vollständiger genomischer Klon aus einer λ EMBL3-Bank isoliert werden. Für die Bestimmung der exakten Intron-Positionen wurde die vollständige cDNA mittels RT-PCR amplifiziert, kloniert und sequenziert. Die Sequenz des genomischen Klons der DXR aus *Prymnesium* wurde in der Datenbank des NCBI hinterlegt (Acc. Nr.DQ863277).

3.5.10 PCR-Amplifikation von Genfragmenten für Enzyme des MVA- und des MEP-Wegs aus dem Haptophyten *Emiliana huxleyi*

Ein Hauptaspekt dieser Arbeit war die Untersuchung der Verbreitung der beiden IPP-Biosynthesewege in Haptophyten und der phylogenetischen Beziehungen der daran beteiligten Gene. Analog zur Vorgehensweise bei *Mesostigma* und *Cyanophora* (Kap. 3.4.2) sollten die Gene für die Enzyme dieser beiden Stoffwechselwege in dem Modellorganismus *Emiliana huxleyi* (Kap. 1.3.1) durch PCR-Amplifikationen nachgewiesen und daraus Erkenntnisse über die Entstehung der komplexen Algen mit roten Plastiden im Zuge von sekundären Endosymbiosen gewonnen werden. Algenmaterial von *Emiliana* wurde von der Sammlung für Algenkulturen in Göttingen (SAG, Nr. 33.90) bezogen und unter den in Kapitel 2.6.2 beschriebenen Bedingungen kultiviert. Aus dem Zellmaterial wurde poly(A)⁺-RNA isoliert (Kap. 2.7.5) und für RT-PCR-Reaktionen eingesetzt (Kap. 2.8.4).

Da im Verlauf der vorliegenden Arbeit die Sequenz-Rohdaten des Genom-Sequenzierungsprojektes von "*Ehux*" (Kap. 1.3.1) freigegeben wurden, war es nicht mehr notwendig, die bei *Mesostigma* und *Cyanophora* bewährte RT-PCR-Strategie mit degenerierten Primern einzusetzen. Die genomischen Sequenz-Rohdaten sind als TRACE-Files in der Datenbank des NCBI verfügbar und können mit der BLAST-Funktion durchsucht werden (Kap. 3.1). Die Rohdaten des Sequenzierungsprojektes wurden zur Etablierung der Gene für die IPP-Biosynthese genutzt. Es konnten auf diese Weise die genomischen Sequenzen für vier der fünf Gene des cytosolischen MVA-Pathways, sowie für alle sieben Gene des plastidären MEP-Pathways aus *Emiliana* etabliert werden. Lediglich für die PMK, das vierte Enzym des MVA-Wegs, ließen sich durch die BLAST-Suchen keine Sequenzinformationen gewinnen. Bisher sind nur wenige PMK-Sequenzen aus anderen Organismen bekannt, und diese weisen auf Aminosäure-Ebene einen geringen Konservierungsgrad auf.

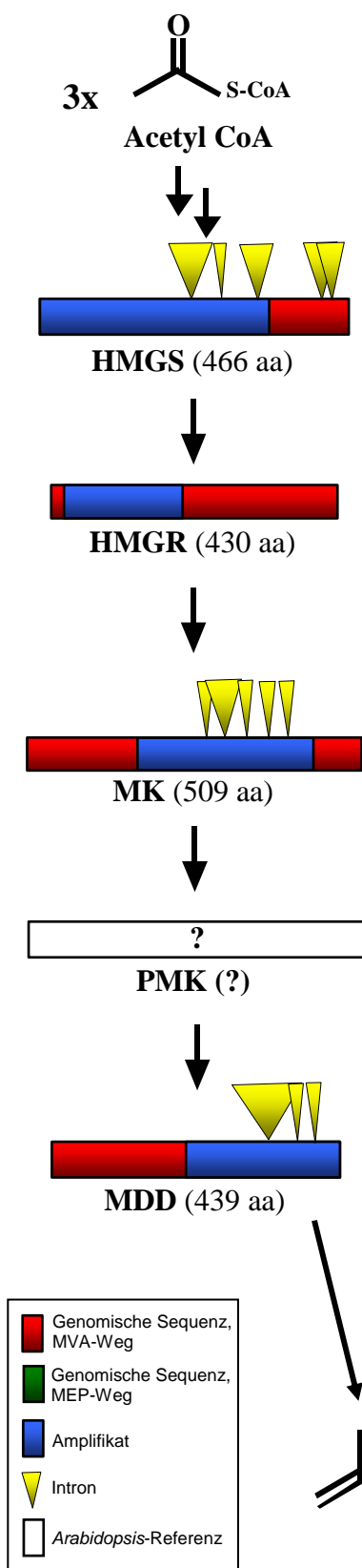
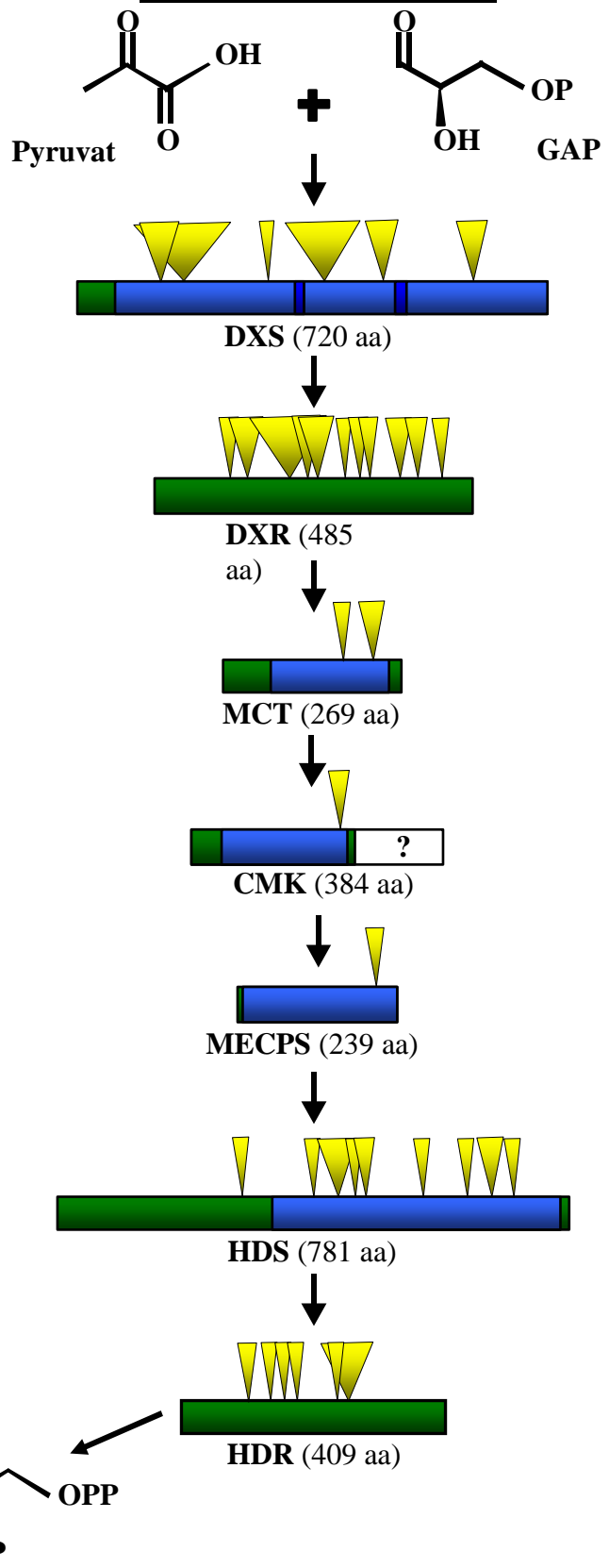
MVA-Pathway (Cytosol)**MEP-Pathway (Plastid)**

Abb. 22: IPP-Biosynthesewege in *Emiliania huxleyi*: Lage und Größe (relativ zum Protein) der im jeweiligen Gen des MVA- bzw. MEP-Wegs vorhandenen Introns und der *via* RT-PCR amplifizierten cDNA-Fragmente. Die zur Amplifikation eingesetzten Primer sind im Anhang aufgeführt (Kap. 7.1, Kap. 7.2). (aa): Größe des Proteins in Aminosäuren. Abkürzungen der Protein-Bezeichnungen siehe Kapitel 1.6.

Möglicherweise ist es daher einfach ein technisches Problem, die Sequenz der PMK aus *Emiliana* mit der Nukleotid-BLAST-Funktion des NCBI unter Verwendung von Sequenzen aus anderen Organismen zu etablieren. Sämtliche TRACE-Files, aus denen die vollständigen genomischen Sequenzen der Gene aus *Emiliana* assembliert wurden, sind im Anhang aufgeführt (Kap. 7.6).

Die etablierten genomischen Sequenzen der Gene aus *Emiliana* enthalten zahlreiche Introns, deren ungefähre Position innerhalb des Genes sich durch Homologievergleiche der AS-Sequenz mit dem Alignment vorhersagen lässt. Die Bestimmung ihrer exakten Position *in silico* wird dadurch erschwert, dass die Introns in *Emiliana* häufig nicht der "GT-AG-Regel" folgen, und die Donorstelle stattdessen aus -GC- oder auch -GA- besteht. Um die exakte Position der Introns und damit die kodierende Sequenz der Gene zu bestimmen, wurden ausgehend von poly(A)⁺-RNA RT-PCR-Reaktionen (Kap. 2.8.4) mit spezifischen Primern durchgeführt. Auf diese Weise konnten Fragmente von vier der fünf Genen des MVA-Wegs und sechs der sieben Gene des MEP-Wegs amplifiziert und die codierenden Sequenzen in diesen Bereichen bestimmt werden. Lediglich die Amplifikation eines Fragments der DXR (pla-2) war trotz wiederholter Versuche mit verschiedenen genspezifischen Primern nicht möglich, was auf eine sehr niedrige Expressions-Rate oder technische Probleme wie zum Beispiel Sekundärstrukturen der RNA zurückzuführen sein kann. Auch die Amplifikation eines Fragmentes der noch unbekannten PMK (cyt-4) mit den im Anhang (Kap. 7.1) aufgeführten degenerierten Primern gelang nicht. Für alle weiteren Gene des cytosolischen MVA-Wegs konnten durch die Verwendung der genspezifischen Primer RT-PCR-Amplifikate etabliert werden. Die Länge und die relative Lage der Fragmente sowie die Positionen der Introns innerhalb des jeweiligen *Emiliana*-Gens sind in Abbildung 22 dargestellt. Dabei spiegelt die unterschiedliche Breite der Dreiecke die jeweilige Sequenzlänge des Introns relativ zum Protein wider.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten aus genomischen und RT-PCR-Sequenzen folglich die Sequenzen für vier der fünf Gene des MVA-Wegs und für alle Gene des MEP-Wegs aus dem Haptophyten *Emiliana huxleyi* etabliert werden. Die von den kodierenden Sequenzen abgeleiteten AS-Sequenzen wurden für die phylogenetischen Analysen verwendet (Kap. 3.7, Kap. 3.8).

3.5.11 Zusammenfassung der Verbreitung von MVA- und MEP-Weg in den Alveolata und "Chromista"

Die Verbreitung der beiden IPP-Biosynthesewege in den verschiedenen in dieser Arbeit untersuchten Vertretern der Alveolata und der "Chromista" ist zur Übersicht in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tab 8: Verbreitung von MVA- und MEP-Weg in den in dieser Arbeit untersuchten Vertretern der Alveolata und "Chromista". *: nur HMGS.

Superensemble	Abteilung	MVA (cyt)	MEP (pla)
Alveolata	Apicomplexa	-	+
	Dinophyta	(+)*	+
	Perkinsea	-	+
	Ciliata	+	-
"Chromista"	Diatomeen (Stramenopile)	+	+
	Oomyceten (Stramenopile))	+	-
	Cryptophyta	?	+
	Haptophyta	+	+

In den Apicomplexa, den Peridinin-haltigen Dinophyta und den Perkinsea konnten ausschließlich Gene für Enzyme des MEP-Wegs nachgewiesen werden. Die Ciliata als vierte Gruppe der Alveolata hingegen besitzen keinen Plastiden und verfügen dementsprechend ausschließlich über den cytosolischen MVA-Weg.

Alle photosynthetisch aktiven Vertreter der "Chromista" (Diatomeen, Cryptophyta, Haptophyta) besitzen Gene für den plastidären MEP-Weg, Diatomeen und Haptophyten auch für den MVA-Weg. Die Existenz des MVA-Wegs in Cryptophyten wurde nicht untersucht. Analog zu den Ciliaten synthetisieren auch die Oomyceten als nicht-phototrophe Vertreter der Stramenopilen IPP ausschließlich über den cytosolischen MVA-Weg.

3.6 Untersuchung der subzellulären Lokalisation der HMGR, DXS und DXR in *Phaeodactylum tricornutum*

In höheren Pflanzen ist der MVA-Pathway im Cytosol lokalisiert, wohingegen der MEP-Pathway charakteristisch für den Plastiden ist (Kap. 1.6). Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals die Existenz beider Wege in verschiedenen Gruppen der komplexen Algen nachgewiesen (Kap. 3.5). Unter Verwendung des für die Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* etablierten Systems zur stabilen genetischen Transformation (Kap. 2.11) wurde in der hier vorliegenden Arbeit die subzelluläre Lokalisation der HMGR (cyt-2), der DXS (pla-1) und der DXR (pla-2) in dieser komplexen Alge mit rotem Plastiden untersucht.

Die N-Termini der abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen für die DXS und die DXR enthalten putative Signal-Transit-Peptide einschließlich des für den Import in den *Phaeodactylum*-Plastiden benötigten konservierten AFAP-Motivs (Kap. 1.4; Kap. 7.7), was eine plastidäre Lokalisation analog zu den Landpflanzen und dem Apicomplexen *Plasmodium falciparum* nahe legt. Im Gegensatz dazu enthält die wahrscheinlich cytosolische HMGR keine derartige N-terminale Extension (Alignments nicht gezeigt).

Die Sequenzen der DXS und der DXR aus *Phaeodactylum* waren aus den genomischen TRACE-Files des NCBI assembliert worden (Kap. 3.5.6). Um mögliche "versteckte" Introns in der N-terminalen Extension zu detektieren und die korrekte kodierende Sequenz zu bestimmen, wurden die Sequenzen der beiden Gene unter Verwendung von genspezifischen Primern (Kap. 7.2) durch RT-PCR aus poly(A)⁺ (Kap. 2.8.4) amplifiziert (Daten nicht gezeigt). Ein HMGR-Klon war bereits aus einer cDNA-Bank isoliert worden (Kap. 3.5.7). Anhand der kodierenden Sequenzen wurden anschließend Primer für die Amplifikation der zu untersuchenden N-Termini der drei Gene konzipiert (Kap. 7.2) und für PCR-Amplifikationen unter Verwendung von cDNA als Matrize eingesetzt. Es wurden die jeweils 5'-terminalen Sequenzen der Gene für diese drei Enzyme durch PCR amplifiziert und gerichtet vor das Gen für das "enhanced green fluorescent protein" (eGFP) kloniert, so dass ein Fusionsprotein mit durchgängigem Leseraster entstand (Kap. 2.11). Dabei wurde bei der DXS und der DXR jeweils die Sequenz für das vollständige Signal-Transit-Peptid sowie einen etwa 50 AS langen Teil des reifen Proteins (bestimmt anhand der Sequenz aus *Arabidopsis*) kloniert, um sicherzugehen, dass die für eine eventuelle Translokation durch die Plastidenmembranen nötige Sequenz vollständig vorhanden ist. Von der HMGR wurde die Sequenz vom Start-Methionin bis zu AS 260 des reifen Proteins (Nummerierung anhand der Protein-Sequenz aus *Arabidopsis*) kloniert. Abbildung 13 (Kap. 2.11) verdeutlicht schematisch die Klonierungsstrategie, die für die

3 Ergebnisse

Herstellung der Reporter-gen-Konstrukte verfolgt wurde. Die Sequenzen der eingesetzten Primer sowie der amplifizierten 5'-terminalen Bereiche der HMGR, DXS und DXR sind im Anhang aufgeführt. Es konnten die Sequenzen für alle drei Gene amplifiziert, zusammen mit eGFP gerichtet in den Vektor pPha-T1 kloniert und das Konstrukt zur Kontroll-Sequenzierung in *E. coli* vermehrt werden. Alle drei Konstrukte wurden in je zwei unabhängigen Reaktionen an Wolfram-Partikel gebunden und jeweils mit vier unterschiedlichen Drücken von 600, 900, 1100 und 1350 psi zur Transformation von *Phaeodactylum* eingesetzt. Die Transformations-Effizienz zeigte keine signifikanten druckabhängigen Unterschiede (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu schien die Anzahl der transformierten Zellen stark durch das jeweilige Konstrukt beeinflusst zu werden. Während nach 21 Tagen Inkubation auf Zeocin-haltigen Agar-Platten (Kap. 2.6.2) insgesamt 43 Kolonien mit der transformierten DXS- und 30 Kolonien mit der DXR-Präsequenz zu verzeichnen waren, hatten sich lediglich zwei unabhängige mit dem HMGR-Fragment transformierte Zellen zu Kolonien entwickelt.

Die transformierten *Phaeodactylum*-Kolonien wurden unter Verwendung eines konfokalen Laserscanning Mikroskops (LSM) auf die Lokalisation der eGFP-Fluoreszenz innerhalb der Zelle untersucht (Kap. 2.11). In den beiden mit dem HMGR-Fragment transformierten Kolonien konnte keine eGFP-Fluoreszenz detektiert und die Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle daher nicht bestimmt werden (Daten nicht gezeigt). Nur wenige der mit der DXS- bzw. der DXR-Präsequenz transformierten Zellen zeigten eine starke eGFP-Fluoreszenz. Abbildung 23 zeigt die LSM-Aufnahmen der beiden Transformanten mit den laborinternen Bezeichnungen DXS_52-7 und DXR_7-5.

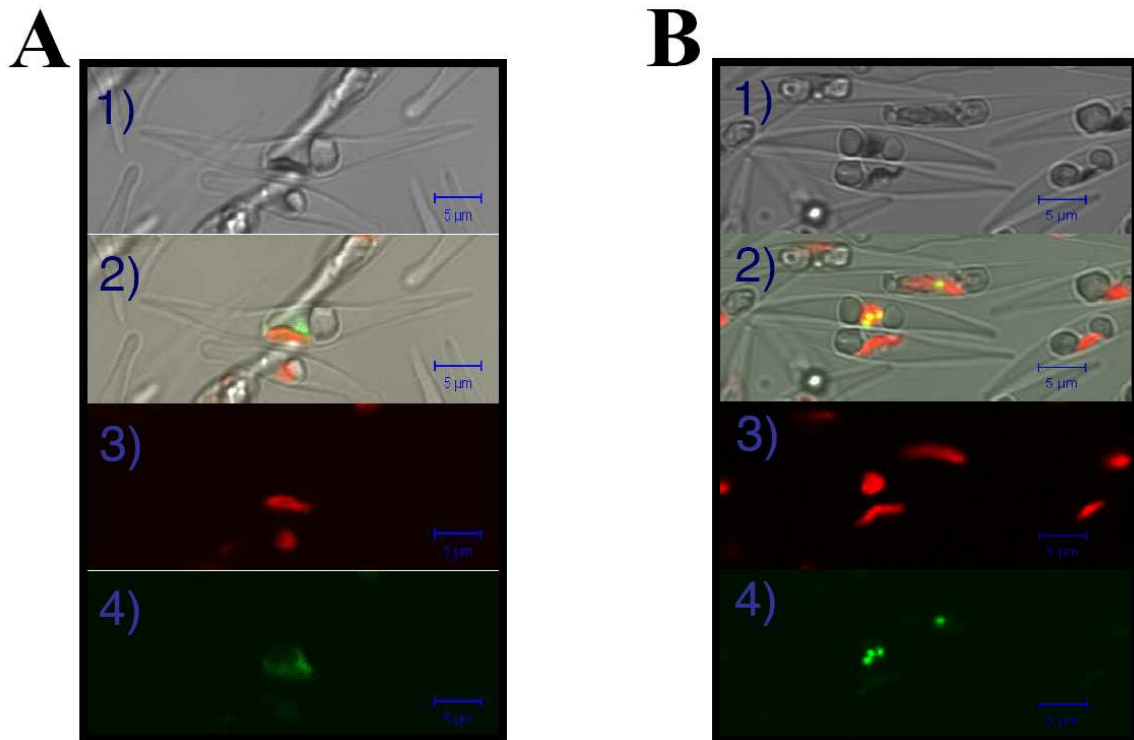


Abb. 23: LSM-Aufnahmen transformierter *Phaeodactylum*-Zellen. A: Konstrukt aus DXS (pla-1) und eGFP. B: Konstrukt aus DXR (pla-2) und eGFP. 1) Hellfeld-Aufnahme; 2) Hellfeld mit Eigenfluoreszenz des Chlorophyll a (rot) und eGFP-Fluoreszenz (grün); 3) Eigenfluoreszenz des Chlorophyll; 4) eGFP-Fluoreszenz.

Die Teil-Bilder A1) und B1) zeigen jeweils die Hellfeld-Aufnahme der Zellen. In den Bildern 3) ist die eGFP-Fluoreszenz herausgefiltert und nur die Eigenfluoreszenz des Chlorophyll a aus dem komplexen Plastiden dargestellt. Die Bilder 4) zeigen die eGFP-Fluoreszenz, hier ist die Chlorophyll-Fluoreszenz herausgefiltert. Eine Überlagerung aller drei Bilder ist jeweils in 2) dargestellt, sodass die relative Position der fluoreszierenden Bereiche zueinander sowie innerhalb der Zelle verdeutlicht wird. eGFP- und Chlorophyll a-Fluoreszenz sind in allen Transformanten räumlich voneinander getrennt, das eGFP ist folglich nicht innerhalb des Plastiden lokalisiert. Vielmehr zeigt sich jeweils eine Ausbildung sphärischer Bereiche außen am Plastiden mit einem konzentrierten Vorkommen von eGFP. Diese Strukturen entsprechen den von Kilian und Kroth (2005) beschriebenen "blob"-like structures (BLS), die sich bei der Transformation mit einer unvollständigen Signal-Transit-Sequenz ausbilden und wahrscheinlich zwischen den beiden inneren Hüllmembranen des Plastiden lokalisiert sind (Kap. 1.4). Sie entstehen wahrscheinlich dadurch, dass das Konstrukt zwar durch die äußeren Hüllen des Plastiden transportiert wird, die innere Membran jedoch nicht durchtreten kann und dort akkumuliert. Die in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte wurden so konzipiert, dass jeweils die N-terminale Extension sowie zusätzlich noch ein Teil des reifen Proteins der DXS bzw. der DXR vor das eGFP kloniert wurden, um die Vollständigkeit der für die Lokalisation

3 Ergebnisse

notwendigen Sequenz zu gewährleisten. Möglicherweise beruht die Akkumulation in BLS auf einer Ausbildung von Sekundärstrukturen innerhalb der Fusionsproteine, die die für die Translokation nötigen Wechselwirkungen mit den Membranen des Plastiden behindern. Eine Lokalisation der DXS und der DXR in den komplexen Plastiden der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* konnte im Rahmen dieser Arbeit folglich nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die Akkumulation des eGFP in der Plastidenhülle legt dennoch den Transport der Proteine in dieses Kompartiment nahe.

Um die Authentizität der untersuchten *Phaeodactylum*-Transformanten mit den verschiedenen Reportergen-Konstrukten zu überprüfen, wurde die Präsenz der Konstrukte im Genom der Transformanten untersucht (Kap. 2.11.5). Dazu wurde genomische DNA aus den Transformanten DXS_52-7 und DXR_7-5 sowie den beiden HMGR-Transformanten isoliert und für die PCR-Amplifikation der Konstrukte mit dem jeweils Präsequenz-spezifischen forward (+)-Primer und dem eGFP-spezifischen reverse (-)-Primer (Kap. 7.2) eingesetzt. Es konnten aus allen vier Transformanten die jeweils erwarteten Fragmente amplifiziert werden, die Sequenzen dieser Amplifikate sind im Anhang aufgeführt (Kap. 7.7). Folglich war auch in den HMGR-Transformanten das Reportergen-Konstrukt stabil in das Diatomeen-Genom integriert. Eventuell war die Fluoreszenz des eGFP in diesen Zellen zu schwach für eine Detektion, oder Positionseffekte verhindern eine effiziente Transkription des Fusionsgens.

3.7 Phylogenetische Analyse der Gene für die Enzyme des cytosolischen MVA-Wegs der IPP-Biosynthese

Die abgeleiteten AS-Sequenzen der in dieser Arbeit etablierten Enzyme des MVA-Wegs der IPP-Biosynthese wurden phylogenetisch analysiert. Bei den hier dargestellten Stammbäumen handelt es sich um Maximum Likelihood-Analysen, die mittels des Programms "Treefinder" unter Verwendung des WAG+F+ Γ 4 Modells (Kap. 2.12) erstellt wurden. Die Unterstützung für die internen Verzweigungen der Bäume wurde durch Bootstrap-Analysen mit 100 Wiederholungen errechnet, "bootstrap proportion" (BP) Werte über 50% sind an den Verzweigungen angegeben.

Die phylogenetischen Analysen der Sequenzen der HMGS (cyt-1) sind in den Abbildungen 24 und 25 dargestellt. Da die Analysen aller fünf Enzyme des cytosolischen MVA-Wegs der IPP-Biosynthese vergleichbare Topologien zeigen (s. u.), sind die Stammbäume der weiteren vier Enzyme des MVA-Pathways (HMGR, MK, PMK, MDD) im Anhang aufgeführt (Kap. 7.8). Bei allen Genen lässt sich eine tiefe Zweiteilung des Stammbaums feststellen, wobei die eukaryotischen Sequenzen meist zusammen in einem Teilstammbaum I gruppieren, zum Ausschluss der Eubakterien und Archaea in Teilstammbaum II.

3.7.1 Phylogenetische Analyse der HMGS (cyt-1)

Die Treefinder-Topologie der HMGS (cyt-1) in Abbildung 24 beruht auf einer umfassenden Analyse von 69 Sequenzen. Der Baum zeigt eine mit 100% BP statistisch eindeutig unterstützte Zweiteilung in einen eukaryotischen Ast (Gruppe I), in dem alle 41 analysierten Sequenzen aus verschiedenen Gruppen der Eukaryoten vertreten sind, sowie einen prokaryotischen Ast (Gruppe II), der aus 19 eubakteriellen und 9 archaealen Sequenzen besteht. Die Positionierung der Sequenz aus dem Ciliaten *Tetrahymena* zusammen mit den Streptophyten innerhalb der Gruppe I wird statistisch nicht unterstützt und wird in weiteren Analysen mit reduzierten Datensätzen nicht gefunden (Daten nicht gezeigt). Auch die exakte Position der divergenten Sequenzen aus den Protisten *Trichomonas* und *Giardia* sowie aus *Encephalitozoon* (Microsporidia) innerhalb der Gruppe I wird in dieser Analyse nicht aufgelöst und lässt sich durch Subanalysen von reduzierten Datensätzen nicht bestimmen (Daten nicht gezeigt).

3 Ergebnisse

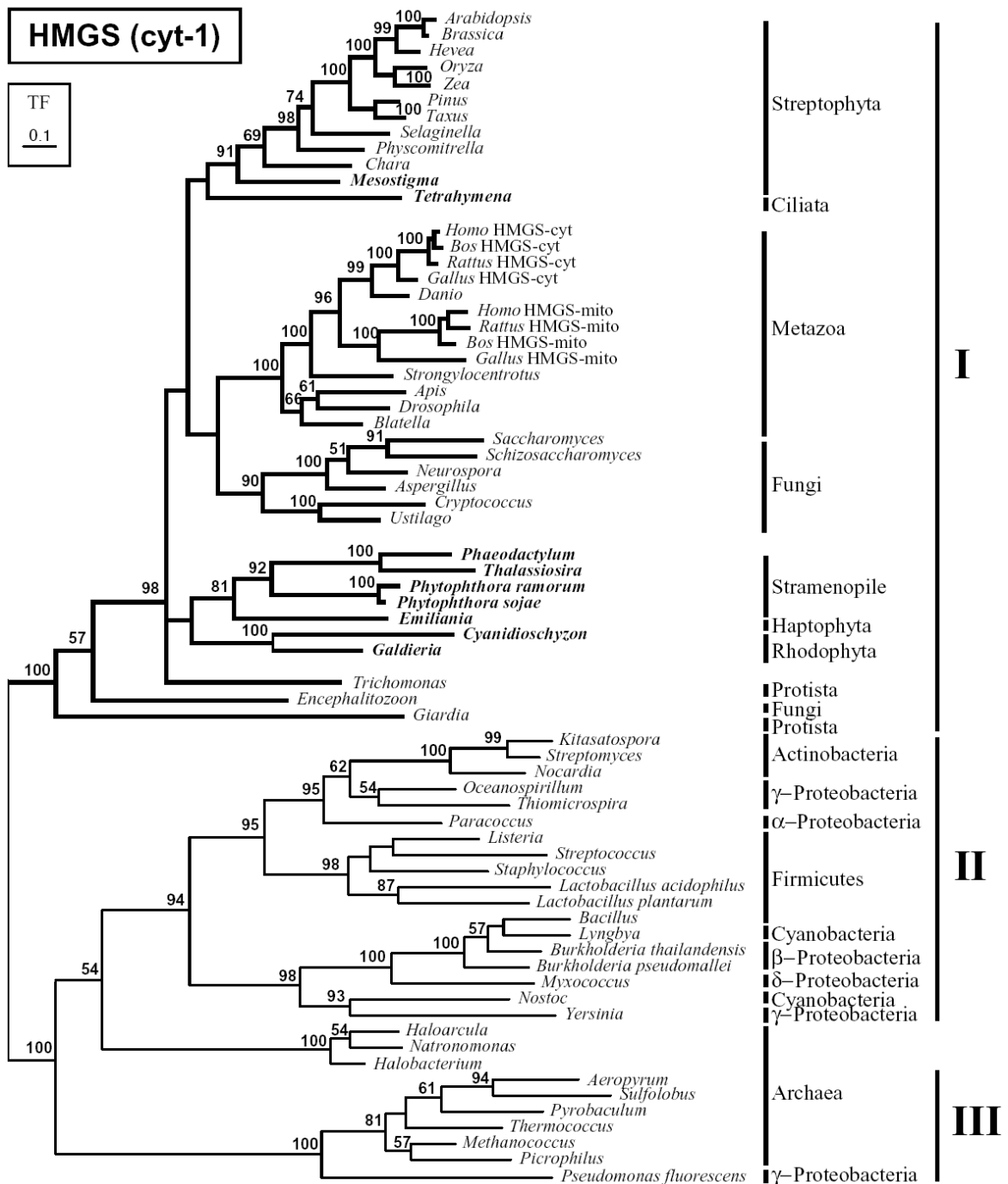


Abb. 24: Treefinder-Topologie der umfassende ML-Analyse der HMGS (cyt-1) aus 69 Organismen.
Bootstrap-Werte über 50% BP sind angegeben. TF: Treefinder.

3 Ergebnisse

Im Gegensatz dazu zeigt die in Abbildung 25-A dargestellte Subanalyse der Gruppe I nach Ausschluss der divergenten Sequenzen eine distinkte Unterteilung in die Sub-Gruppen I-a, I-b und I-c. Gruppe I-c enthält die Sequenzen der Pilze, die mit einem BP von 100% zusammen gruppieren. In I-b befinden sich die HMGS aus den Metazoen, deren gemeinsamer Ursprung ebenfalls statistisch mit 100% BP unterstützt wird. Hierbei gruppieren die Sequenzen des in Säugern und Vögeln vorhandenen mitochondrialen Homologs eng mit deren cytosolischem Enzym zusammen und legen einen Ursprung dieser Sequenzen in einer rezenten Duplikation eines gemeinsamen Vorfahren nahe. Pilze und Tiere gruppieren zum Ausschluss der Sequenzen aus den photosynthetischen Eukaryoten zusammen, die sich in Sub-Ast I-a befinden und deren gemeinsamer Ursprung mit 85% BP unterstützt wird. Dieser Ast enthält die Sequenzen aus Streptophyten (Landpflanzen, *Chara* (Charales) und *Mesostigma*), aus den Rhodophyten *Cyanidioschyzon merolae* und *Galdieria sulphuraria*, aus dem Haptophyten *Emiliana huxleyi* und aus den Stramenopilen *Phaeodactylum tricornutum* und *Thalassiosira pseudonana* (Diatomeen) sowie *Phytophthora ramorum* und *P. sojae* (Oomyceten). Der im Vergleich zu den anderen Sequenzen sehr lange Ast von *Cyanidioschyzon* deutet auf einen verringerten Selektionsdruck auf diese Sequenz hin, möglicherweise geht dies mit einer alternativen Funktion des einzigen Enzyms des cytosolischen MVA-Wegs in dieser Rotalge einher. Die Positionierung der HMGS aus *Chara* und *Mesostigma* basal zu den Streptophyta spiegelt den Ursprung der Landpflanzen in der Linie der Charophyten wider (zusammengefasst in McCourt *et al.* 2004) und stimmt überein mit neueren Analysen, die *Mesostigma* als ursprünglichsten Streptophyten an der Basis der Charophyten und Landpflanzen verifiziert haben (Petersen *et al.* 2006b, Nedelcu *et al.* 2006, Simon *et al.* 2006, Rodríguez-Ezpeleta *et al.* 2006).

Die Position des Haptophyten *Emiliana huxleyi* und der Stramenopilen innerhalb des photosynthetischen Astes I-a wird in der Analyse der Gruppe I in Abbildung 25-A nicht aufgelöst. Eine in Abbildung 25-B dargestellte weitere Reduktion des Datensatzes ausschließlich auf die Sequenzen der Gruppe I-a zeigt jedoch eine statistisch mit 91% BP stark unterstützte Positionierung dieser Organismen als Schwestergruppe der Rhodophyten. Diese Beobachtung ist insofern von Bedeutung, als dass die HMGS als ein Enzym des cytosolischen MVA-Wegs einen wirtszellspezifischen Marker darstellen sollte. Die Monophylie der Plantae ist anhand anderer Wirtszellen-Marker klar belegt (Rodríguez-Ezpeleta *et al.* 2005), offensichtlich haben die Gene für die HMGS aus diesen Organismen jedoch keinen monophyletischen Ursprung. Nichts desto trotz ist die eindeutige, mit einem Bootstrap-Wert von 99% unterstützte Gruppierung von *Emiliana* zusammen mit den Diatomeen und Oomyceten (Stramenopilen) äußerst interessant, da

3 Ergebnisse

sie auf einen gemeinsamen Ursprung der Wirtszellen dieser Organismengruppen oder aber auf den Transfer von einem sekundären zu einem tertiären Wirt hindeuten könnte.

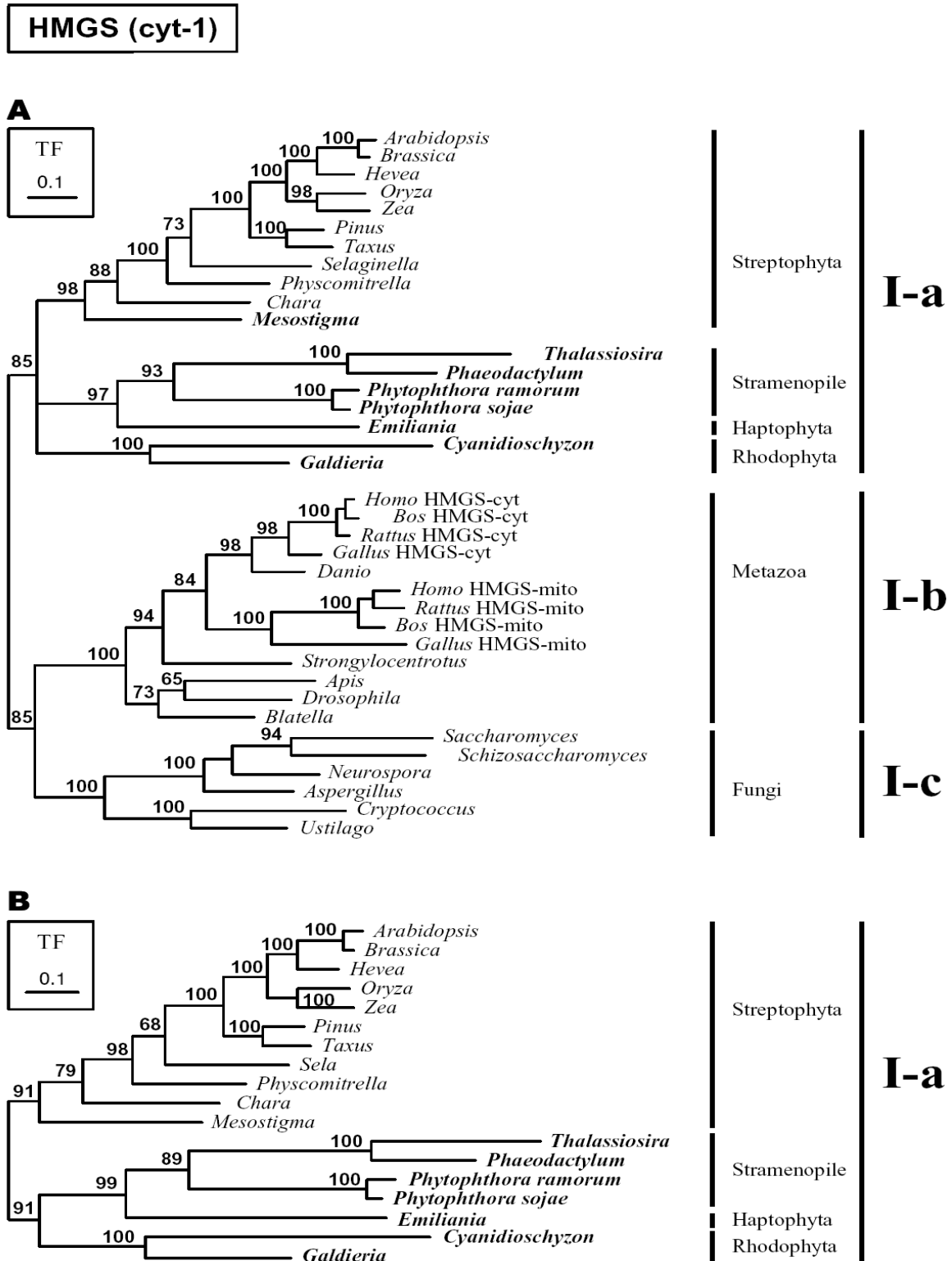


Abb. 25: Treefinder-Topologien der HMGS-Subanalysen. A: Subanalyse der Gruppe I, in der die eukaryotischen Sequenzen gruppieren. B: Subanalyse von I-a mit den photosynthetischen Eukaryoten und *Phytophthora*. TF: Treefinder.

3.7.2 Evolution des MVA-Wegs in Streptophyten und Rhodophyten (Plantae)

Der gemeinsame Ursprung der HMGS (cyt-1) in den Streptophyten und den Rhodophyten wird in der Analyse des Teilstammbaums I (Abb. 25-A) mit einem Bootstrap-Wert von 85% unterstützt. Allerdings deutet die enge Assoziation der Plantae mit den Sequenzen aus Stramenopilen und dem Haptophyten *Emiliania* auf eine nicht-vertikale Evolution durch endosymbiotische oder laterale Gentransfers hin. Die statistische Unterstützung für einen monophyletischen Ursprung der HMGS aus Streptophyten und Rhodophyten steigt nach Ausschluss der Sequenzen aus *Emiliania* und den Stramenopilen auf 89% (Daten nicht gezeigt). Ein vergleichbares Bild zeichnet sich für die weiteren vier Gene des MVA-Wegs ab. Die hierbei teilweise nur mäßige statistische Unterstützung der Monophylie der Plantae könnte u. a. auf dem Fehlen von Sequenzen aus Schlüsselorganismen wie z. B. den Chlorophyten beruhen.

Die umfassende Analyse der HMGR (cyt-2) kann die Position von *Galdieria* innerhalb des eukaryotischen Substammbaums I nicht auflösen (Kap. 7.8, Abb. 32), in der Subanalyse (Abb. 33) nach Ausschluss divergenter Sequenzen erhält die Gruppierung dieser Rotalge zusammen mit den HMGR-Sequenzen aus den Streptophyten, *Emiliania* und den Stramenopilen jedoch eine statistische Unterstützung von 98% BP.

Ein monophyletischer Ursprung der MK (cyt-3) aus *Galdieria* zusammen mit den Streptophyten wird nicht statistisch unterstützt (Kap. 7.8, Abb. 34 und Abb. 35), und die Position von *Galdieria* wird auch nach Ausschluss der Sequenzen aus dem Haptophyten und den Stramenopilen nicht aufgelöst (Daten nicht gezeigt). Auffällig in dieser Analyse ist der vergleichsweise lange Ast der Streptophyten, der diese Gruppe von den anderen Eukaryoten distanziert.

Die PMK (cyt-4) aus *Galdieria* gruppiert mit einer statistischen Unterstützung von 86% BP zusammen mit den eukaryotischen Sequenzen aus den Streptophyten, der Diatomee *Thalassiosira* sowie aus den Kinetoplastiden (Trypanosomen, *Leishmania*) (Kap. 7.8, Abb. 36), deren Position in den Analysen anderer Gene i. A. nicht aufgelöst wird. Die Sequenzen der PMK aus den verschiedenen Organismen scheinen generell sehr schnell zu evolvieren, wie die umfassende Analyse in Abbildung 36-A mit dem extrem langen Ast der Tiere zeigt. Auch die Sequenz aus *Galdieria* hat einen sehr langen Ast, was die mäßige Unterstützung einer gemeinsamen Gruppierung mit den Streptophyten erklärt (BP unter 50%, Daten nicht gezeigt).

Auch bei der Analyse der MDD (cyt-5) (Kap. 7.8, Abb. 37) zeigt sich ein relativ langer Ast sowohl bei *Galdieria* als auch bei den Streptophyten, der in einer moderaten Bootstrap-Unterstützung von nur 51% (Abb. 38) für eine gemeinsame Gruppierung dieser Sequenzen resultiert.

3.7.3 Die Sequenzen aus den Ciliaten lassen keine phylogenetische Zuordnung zu

Innerhalb der Gruppe der Alveolata verfügen die heterotrophen Ciliaten im Gegensatz zu den Apicomplexa und den Perkinsea über den MVA-Weg der IPP-Biosynthese (Kap. 3.5.11). In der hier vorliegenden Arbeit konnten die Gene für alle fünf Enzyme aus *Tetrahymena* sowie für die HMGR (cytT-2), die MK (cyt-3) und die MDD (cyt-5) aus *Paramecium* etabliert werden (Kap. 3.5.2). Die hier vorliegenden phylogenetischen Analysen zeigen bei der HMGS (cyt-1), der PMK (cyt-4) und der MDD (cyt-5) eine sehr schnelle Evolutionsrate der Gene aus den Ciliaten (Kap. 3.7.1 Abb. 24; Kap. 7.8 Abb. 36 und Abb. 37). Alle drei Gene verursachen aufgrund ihrer Divergenz möglicherweise LBA-Effekte, und ihre genaue Position innerhalb der eukaryotischen Äste der jeweiligen Gene kann nicht bestimmt werden. Die HMGR (cyt-2) aus beiden Organismen gehören als einzige bisher bekannte eukaryotische Sequenzen zur Klasse II dieses Enzyms (Bochar *et al.* 1999), zu der sonst nur prokaryotische Sequenzen zählen, was einen sekundären Erwerb des Gens durch horizontalen Gentransfer (HGT) nahe legt. Die Sequenzen der MK (cyt-3) aus den Ciliaten zeigen eine mit den übrigen Sequenzen vergleichbare Evolutionsrate, allerdings ist die Länge der analysierten Sequenzen von ca. 350 AS nicht ausreichend für eine statistisch abgesicherte phylogenetische Zuordnung der Ciliaten (Rodríguez-Ezpeleta *et al.* 2005)

3.7.4 Monophyletischer Ursprung der Stramenopilen

Diatomeen und nicht-photoautotrophe Oomyceten werden beide den Stramenopilen zugeordnet, für die ein monophyletischer Ursprung der Wirtszellen klar dokumentiert ist (Sogin und Silberman 1998, Tyler *et al.* 2006). Aus den Diatomeen konnten im Rahmen dieser Arbeit die Sequenzen für Gene des MVA- sowie auch des MEP-Wegs etabliert werden, wohingegen aus den aplastidären Oomyceten *Phytophthora ramorum* und *P. sojae* ausschließlich Gene für Enzyme des MVA-Wegs (HMGS, MK, MDD) identifiziert wurden (Kap. 3.5.6). Erwartungsgemäß belegen die phylogenetischen Analysen der Gene für den MVA-Weg einen gemeinsamen Ursprung der HMGS (cyt-1) sowie der MDD (cyt-5) aus Diatomeen und Oomyceten, der mit zwischen 89 und 93% BP (HMGS; Kap. 3.7.1, Abb. 24 und Abb. 25) bzw. 100% (MDD; Kap. 7.8, Abb. 38) statistisch solide unterstützt wird. Die Sequenz der MK (cyt-3) aus der Diatomee *Thalassiosira* gruppiert zusammen mit den Kinetoplastiden innerhalb des sonst prokaryotischen Teilstammbaums II (Kap. 7.8, Abb. 34), was auf ein "gene replacement" durch HGT in den Diatomeen hindeutet, eine

Erklärung, die auch für die plastidäre Sedoheptulose Bisphosphatase (SBP) gilt (Teich *et al.* 2006). Die Sequenz einer MK aus *Phaeodactylum* konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht etabliert werden.

3.7.5 Assoziation der Stramenopilen mit dem Haptophyten *Emiliana huxleyi*

Eine der auffälligsten Besonderheiten der phylogenetischen Analyse der HMGS (cyt-1) ist die mit einem Wert von 99% BP eindeutige Gruppierung der Sequenz aus dem Haptophyten *Emiliana huxleyi* zusammen mit den Sequenzen aus den Stramenopilen (Kap. 3.7.1, Abb. 25-B). Die Sequenzen zeigen einen Ursprung innerhalb des Sub-Astes I-a, in dem die HMGS aus den Streptophyten und den Rhodophyten enthalten sind, und bilden hierbei eine Schwestergruppe der Rhodophyten.

Eine vergleichbare Topologie zeigt sich auch für die HMGR (cyt-2), bei der das Verhältnis von Haptophyten/Stramenopilen und *Galdieria* innerhalb des photosynthetischen Astes nicht aufgelöst wird (Kap. 7.8, Abb. 33).

Auch die Sequenzen der MK (cyt-3) aus den Oomyceten gruppieren zusammen mit *Emiliana* mit einer Unterstützung von 99% BP. Dieser Wert steigt nach Ausschluss der Ciliaten sogar auf 100% an, und auch die Gruppierung zusammen mit *Galdieria* erhält dann eine Unterstützung von 79% BP (Kap. 7.8, Abb. 35).

Die Sequenz einer PMK (cyt-4) aus *Emiliana* konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht etabliert werden. *Thalassiosira* ist in der Analyse dieses Gens der einzige Vertreter der Stramenopilen und zeigt eine mit 86% BP unterstützte Assoziation zur primären Linie und den Kinetoplastiden (Kap. 7.8, Abb. 36-B). Die mangelnde Auflösung ist hierbei möglicherweise auf die beschleunigte Evolutionsrate der Sequenz aus *Galdieria* zurückzuführen (s. o.).

Die Position der Sequenz der MDD (cyt-5) aus *Emiliana* innerhalb des eukaryotischen Astes wird in der phylogenetischen Analyse nicht aufgelöst, wobei hier erneut die unterschiedlichen Evolutionsraten der einzelnen Gene eine Auflösung der phylogenetischen Beziehungen erschweren.

3.8 Phylogenetische Analyse der Gene für die Enzyme des plastidären MEP-Wegs der IPP-Biosynthese

Die abgeleiteten AS-Sequenzen der in dieser Arbeit etablierten Enzyme des MEP-Wegs der IPP-Biosynthese wurden analog zu den Sequenzen des MVA-Wegs phylogenetisch analysiert (Kap. 2.12). Die Unterstützung für die internen Verzweigungen der Bäume wurde ebenfalls durch Bootstrap-Analysen mit 100 Wiederholungen errechnet, Werte über 50% "bootstrap proportion" (BP) sind angegeben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Sequenzen aller sieben Gene für Enzyme des plastidären MEP-Pathways aus Diatomeen und Haptophyten etabliert (Kap. 3.5.6, Kap. 3.5.10). Darüber hinaus konnten Sequenzen der DXR (pla-2) aus einem Dinophyten (Kap. 3.5.3) und einem Cryptophyten (Kap. 3.5.8) sowie partielle Sequenzen der HDR (pla-7) aus einem Cryptophyten (Kap. 3.5.8) sowie aus dem primitiven Streptophyten *Mesostigma viride* und dem Glaucophyten *Cyanophora paradoxa* (Kap. 3.4.3) etabliert werden. Die phylogenetischen Analysen aller Enzyme zeigen in der Tendenz vergleichbare Topologien (s. u.). Daher werden die umfassenden Topologien der Analysen der DXR (pla-2) und der HDR (pla-7) im Folgenden exemplarisch dargestellt. Die phylogenetischen Analysen der weiteren fünf Enzyme des MEP-Pathways (DXS, MCT, CMK, MECPS, HDS) finden sich im Anhang (Kap. 7.8). Bei allen Genen lässt sich eine generelle Zweiteilung des Stammbaums feststellen. Dabei bilden im Allgemeinen die Eukaryoten einen Teilstammbaum I, wohingegen sich die Sequenzen der Eubakterien in einem zweiten Teilstammbaum II befinden.

3.8.1 Phylogenetische Analyse der DXR (pla-2)

Die Treefinder-Topologie der aus ca. 480 Aminosäuren bestehenden DXR (pla-2) in Abbildung 26 beruht auf einer umfassenden Analyse von 88 Sequenzen, in der 33 Eukaryoten und 55 Eubakterien vertreten sind. Der Baum wurde mit den divergenten Sequenzen der Proteobakterien und der Chlorobiales gewurzelt ("out").

Der Stammbaum zeigt eine Zweiteilung in die Gruppe I, zu der die Eukaryoten sowie die Cyanobakterien gehören, und eine Gruppe II mit ausschließlich prokaryotischen DXR-Sequenzen. Die eukaryotischen Gene haben teilweise sehr unterschiedliche Evolutionsraten, dabei evolvieren zum Beispiel die Sequenzen der Apicomplexa sehr viel schneller als die restlichen eukaryotischen Gene. Der gemeinsame Ursprung aller Sequenzen aus den Apicomplexa wird statistisch eindeutig mit 100% BP unterstützt, ihre Position innerhalb des eukaryotischen Asts in der umfassenden Analyse wird allerdings nicht aufgelöst und eine artifizielle Platzierung aufgrund von LBA-Effekten kann nicht ausgeschlossen werden. Die gemeinsame Gruppierung aller anderen photosynthetischen Organismen zusammen mit den Cyanobakterien (98% BP) spiegelt den endosymbiotischen Ursprung der plastidären DXR wider. Die Analyse in Abbildung 26 zeigt eine gemeinsame Gruppierung von Streptophyten und Chlorophyten zum Ausschluss der anderen Sequenzen mit einem Bootstrap-Wert von 100%. Die Rotalgen gruppieren zusammen mit den Sequenzen aus den "Chromista" (Haptophyten, Diatomeen und dem Cryptophyten *Hanusia*). Die Haptophyten *Emiliana* und *Prymnesium* sowie die Diatomeen *Phaeodactylum* und *Thalassiosira* gruppieren dabei jeweils mit 100% BP zusammen. Ein gemeinsamer Ursprung der Sequenzen aus allen Vertretern der "Chromista" wird mit 98% BP stark unterstützt.

Die Sub-Analyse des Teilstammbaums I zusammen mit den Sequenzen aus den Apicomplexa und Dinophyta (Alveolata) in Abbildung 27-A zeigt eine gemeinsame Gruppierung dieser Sequenzen zusammen mit den Rotalgen und den "Chromista" in I-b, die allerdings statistisch nicht unterstützt wird. Innerhalb der Sequenzen der Gruppe I-b evolvieren die Apicomplexa extrem schnell, und auch die sekundären Rotalgen zeigen eine erhöhte Evolutionsrate. Die phylogenetischen Beziehungen zwischen den verschiedenen Gruppen in I-b werden daher schlecht aufgelöst, allerdings wird ein gemeinsamer Ursprung der Chromista auch hier mit 98% BP unterstützt. Nach Ausschluss der divergenten Sequenzen der Alveolata (Abb. 27-B) steigt dieser Wert auf 100% BP und belegt damit eindeutig die gemeinsame Herkunft der DXR aus Haptophyten, Diatomeen und Cryptophyten.

3 Ergebnisse

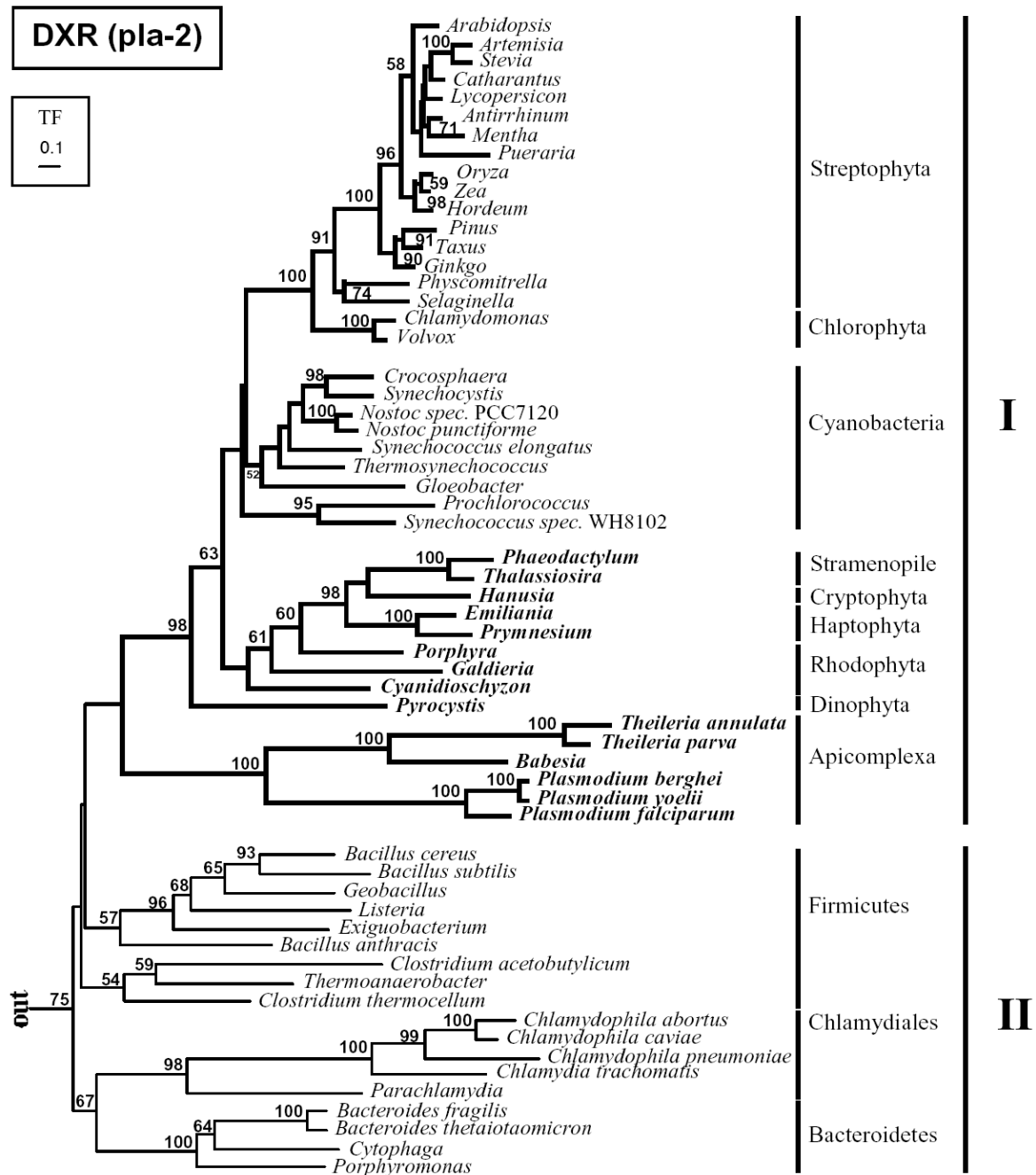


Abb. 26: Treefinder-Topologie der umfassenden ML-Analyse der DXR (pla-2) aus 88 Organismen. Bootstrap-Werte über 50% BP sind angegeben. **out:** Außengruppe mit 28 divergenten Sequenzen aus Proteobacteria und Chlorobiales. **TF:** Treefinder.

Der Ursprung dieser Sequenzen aus den Rotalgen wird in der Sub-Analyse mit moderaten Bootstrap-Werten unterstützt (76% BP) und legt damit den Erwerb der DXR im Kontext der sekundären Endosymbiose mit einer Rotalge nahe.

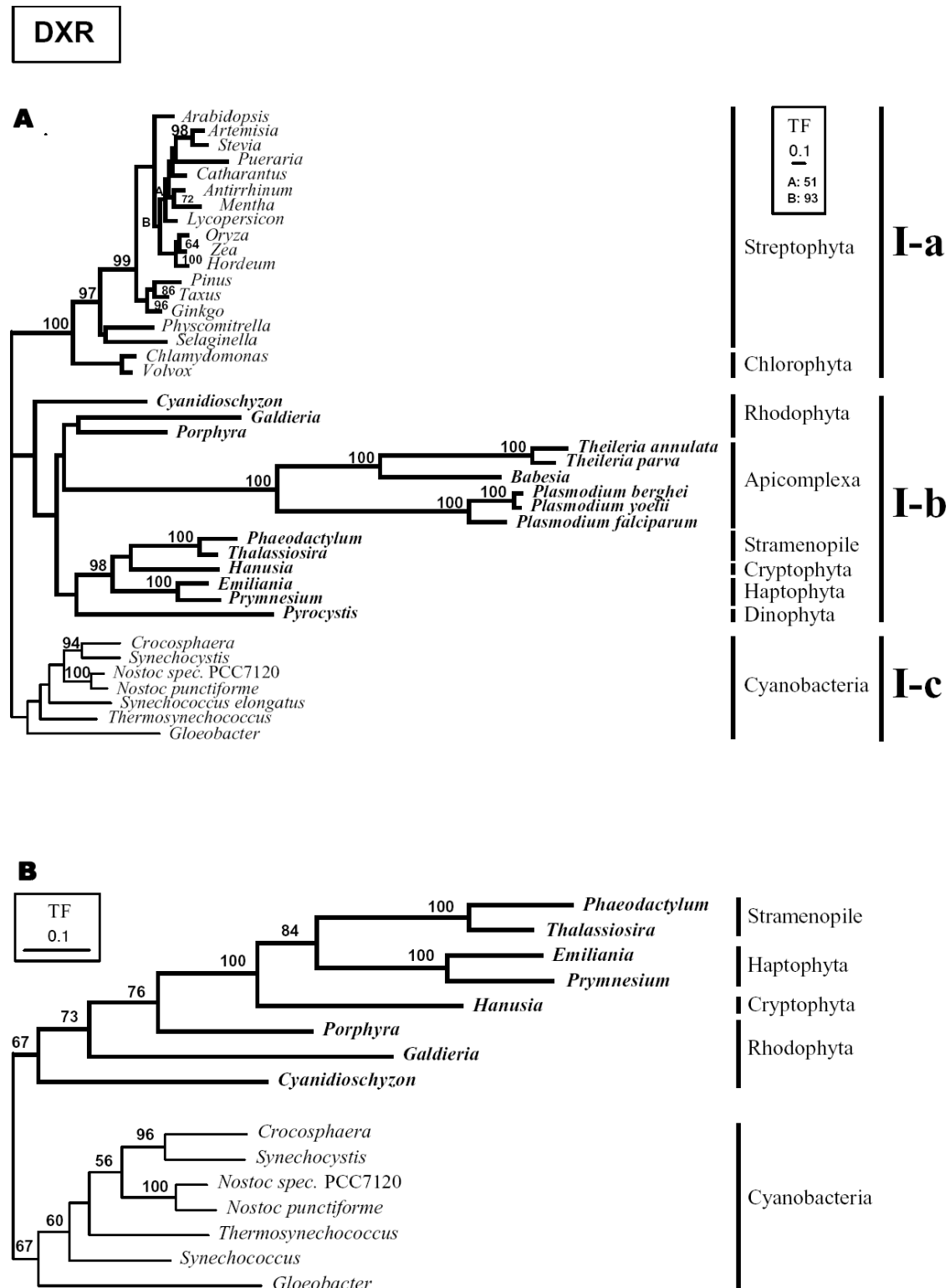


Abb. 27: Treefinder-Topologien der DXR-Subanalysen. **A:** Analyse aller Sequenzen des Teilstammbaums I zusammen mit den divergenten Sequenzen aus den Alveolaten (der Apicomplexa und dem Dinophyten *Pyrocystis*). **B:** Analyse von I nach Ausschluss der divergenten Alveolata und der monophyletischen Gruppe der Streptophyten/Chlorophyten. **TF:** Treefinder.

3 Ergebnisse

Die im Rahmen dieser Arbeit durch Datenbankrecherchen aus den Rohdaten des TIGR Genom-Sequenzierungsprojekts etablierte Sequenz der DXR aus dem Alveolaten *Perkinsus marinus* (Kap. 3.5.5) wurde ebenfalls phylogenetisch analysiert. Die Sequenz zeigt ebenfalls eine gemeinsame Gruppierung zusammen mit den Sequenzen aus komplexen Algen und Apicomplexa in der Gruppe I-b (Daten nicht gezeigt). Die Analyse dieses Teilstammbaums in Abbildung 28 legt einen gemeinsamen Ursprung der DXR aus *Perkinsus* und dem Dinophyten *Pyrocystis* nahe. Dieser ist jedoch statistisch nicht unterstützt, was an der Divergenz der Sequenzen liegen könnte. Diese Gruppierung entspricht den bisherigen Analysen von wirtszellspezifischen Markern, die einen gemeinsamen Ursprung der Perkinsea und der Dinophyten belegen (GPI, diese Arbeit Kap. 3.3.7.2; Reece 1997; Saldarriaga *et al.* 2003; Leander und Keeling 2003).

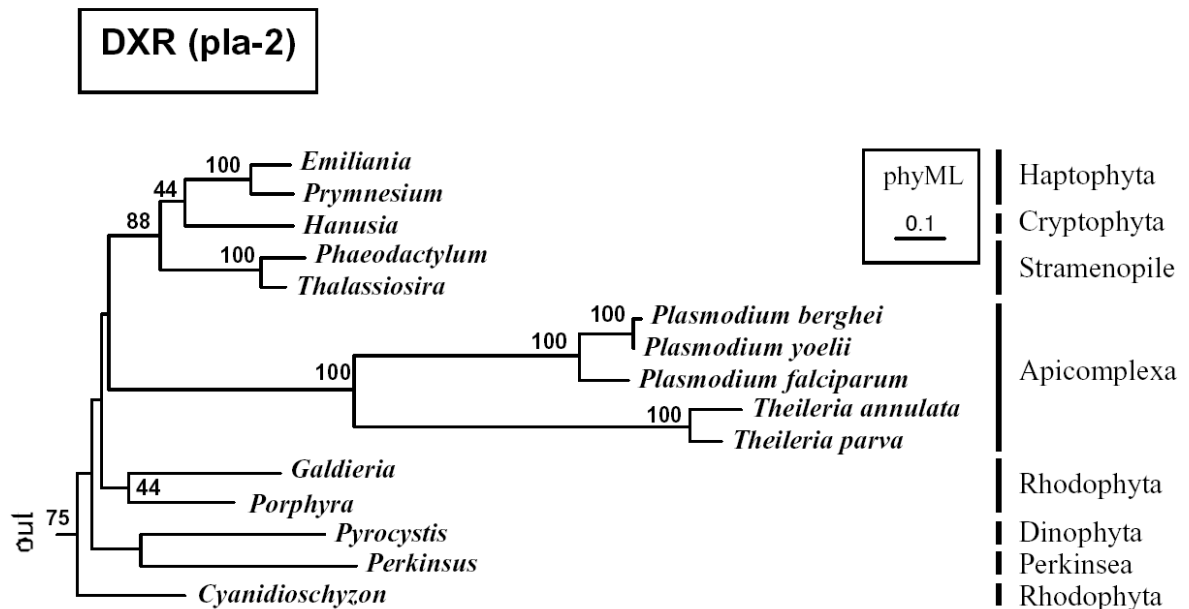


Abb. 28: Phylogenetische Analyse des Teilstammbaums I der DXR unter Einbeziehung der Sequenz aus *Perkinsus marinus*. out: Außengruppe = Sequenzen der Streptophyta/Chlorophyta und der Cyanobakterien. phyML: Phylip Maximum Likelihood.

3.8.2 Phylogenetische Analyse der HDR (pla-7)

Abbildung 29 zeigt die Treefinder-Topologie der umfassenden ML-Analyse der ca. 470 AS umfassenden HDR (pla-7) aus 28 eukaryotischen und 50 eubakteriellen Sequenzen. Als Außengruppe zum Wurzeln des Baums dienten die divergenten Sequenzen der Clostridia, der δ/ϵ -Proteobacteria und von Vertretern der Bacteroidetes/Chlorobi-Gruppe.

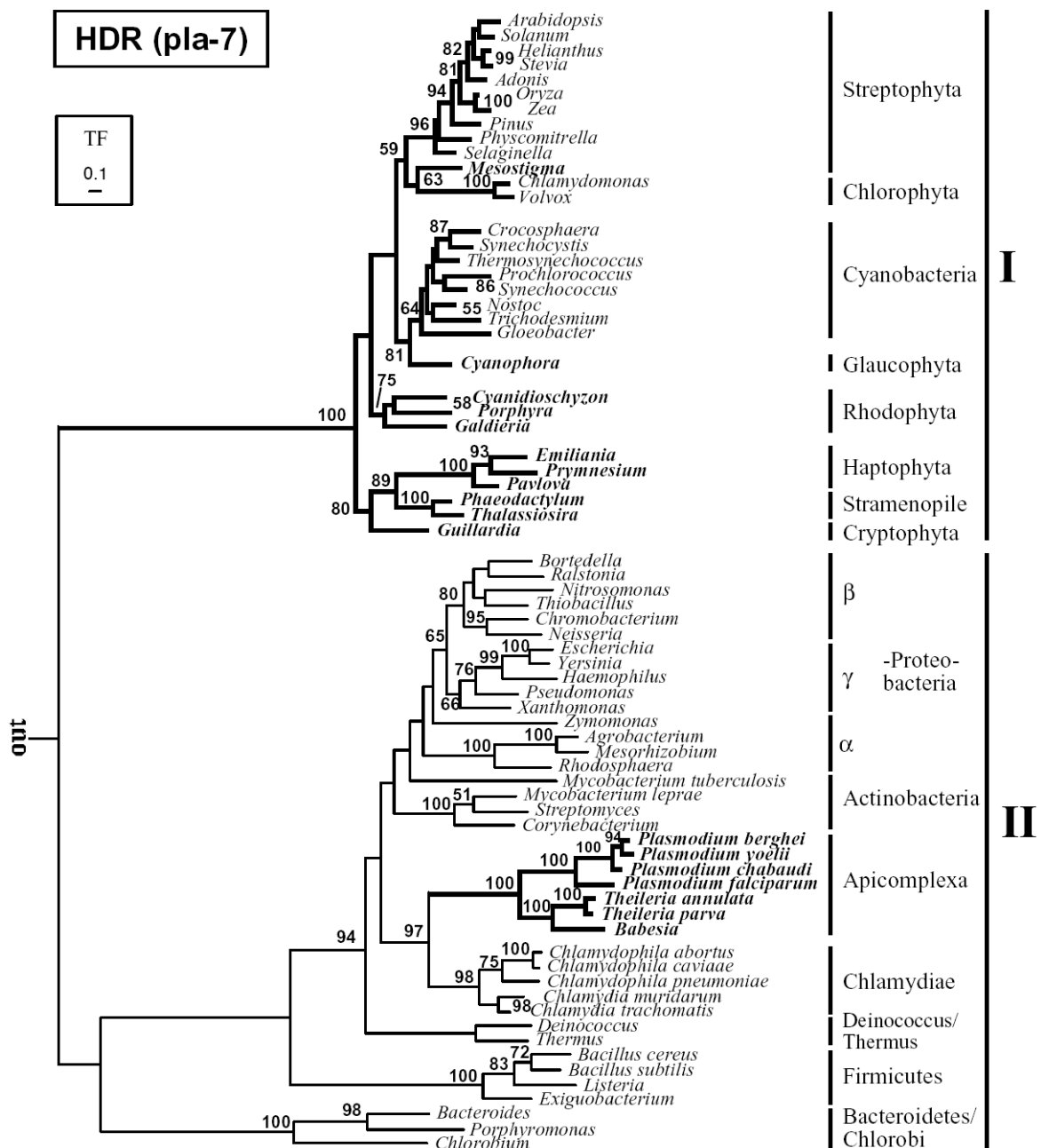


Abb. 29: Treefinder-Topologie der umfassenden ML-Analyse der HDR (pla-7) aus 78 Organismen. Bootstrap-Werte über 50% BP sind angegeben. **out:** Außengruppe der zehn divergenten Sequenzen aus den Clostridia, δ/ϵ -Proteobacteria und Bacteroidetes/Chlorobi. **TF:** Treefinder

3 Ergebnisse

Der Stammbaum zeigt analog zur DXR (Kap. 3.8.1) eine deutliche Zweiteilung in eine Gruppe I, in der fast alle Eukaryoten sowie die Cyanobakterien gruppieren, und eine prokaryotische Gruppe II. Im Gegensatz zur DXR ist die Evolutionsrate der HDR aus den Apicomplexa in dieser Analyse vergleichbar mit der der restlichen Organismen, und diese Sequenzen gruppieren innerhalb des sonst prokaryotischen Astes mit einer Bootstrap-Unterstützung von 97% zusammen mit den Sequenzen aus den Chlamydiae. Mit Ausnahme der Apicomplexa, die das Gen möglicherweise durch HGT erworben haben, ist das Gen aller anderen Eukaryoten endosymbiotischen (cyanobakteriellen) Ursprungs. Der Teilstammbaum I enthält ausschließlich Sequenzen photosynthetischer Eukaryoten und der Cyanobakterien, eine Subanalyse dieses Teilstammbaums ist in Abbildung 30 dargestellt.

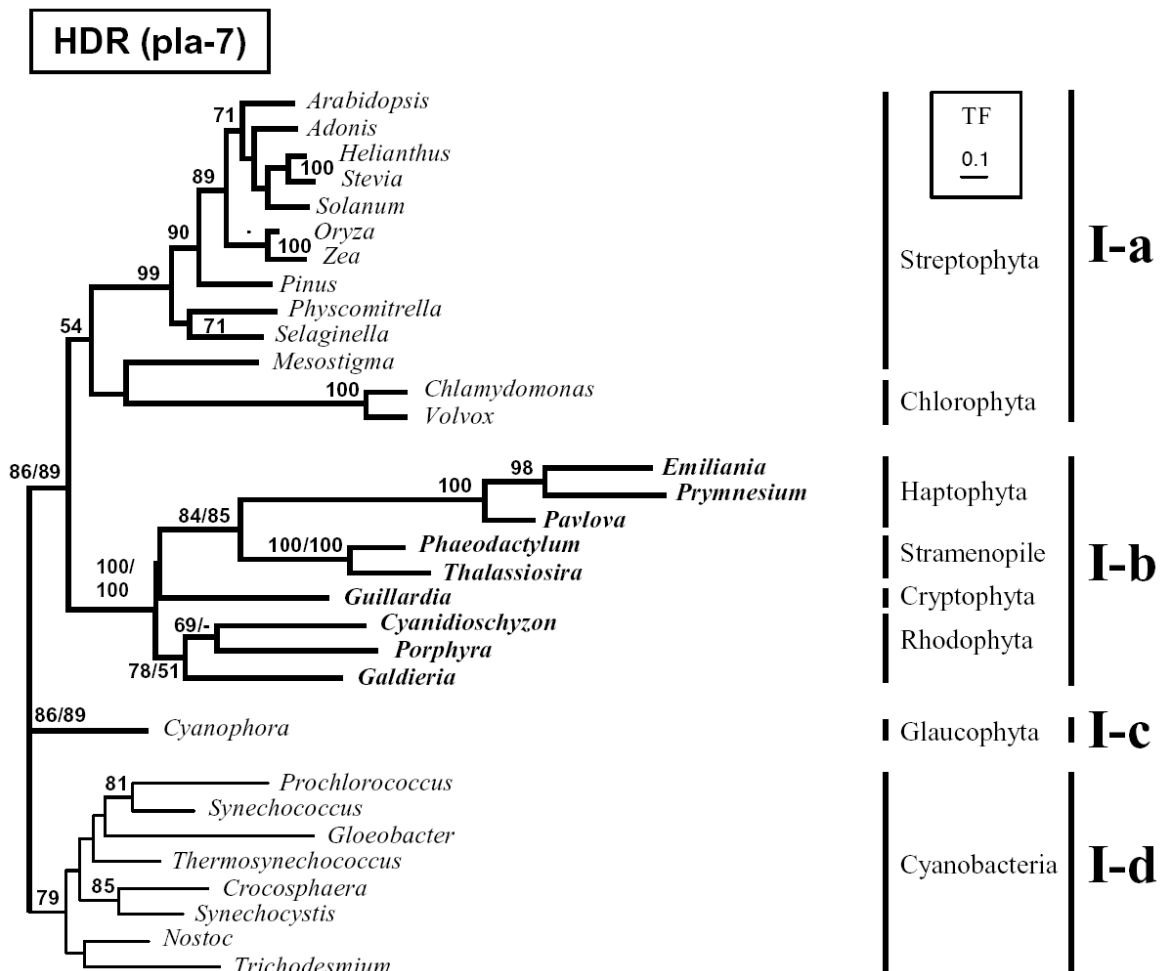


Abb. 30: Treefinder-Topologie der Analyse des Teilstammbaums I der HDR (pla-7). Die Bootstrap-Werte in Teilstammbaum I-b geben die statistische Unterstützung für die Analyse mit/ohne die partiellen Sequenzen aus *Prymnesium* und *Pavlova* an. **TF:** Treefinder.

In dieser Analyse von Sequenzen der Plantae (Grünalgen/Landpflanzen, Rotalgen und Glaucophyta) und der "Chromista" sind zusätzlich zu den in der Analyse der DXR untersuchten Organismen auch noch partielle Sequenzen aus dem primitiven Streptophyten *Mesostigma viride* und dem Glaucophyten *Cyanophora paradoxa* (Kap. 3.4.3) sowie aus den Haptophyten *Prymnesium parvum* und *Pavlova lutheri* (Kap. 3.4.9) vertreten. Gruppe I-d enthält die Sequenzen der Cyanobakterien, die mit einer moderaten Unterstützung von 79% BP zum Ausschluss der Eukaryoten zusammen gruppieren und als Außengruppe zum Wurzeln des Baums dienen. Die Sequenz aus dem Glaucophyten *Cyanophora* spaltet mit einer soliden Unterstützung von 86 bzw. 89% vor der Auftrennung von Rotalgen und Grünalgen/Landpflanzen ab. Der gemeinsame Ursprung von Streptophyten und Chlorophyten in Gruppe I-a wird mit 54% BP kaum unterstützt. Der Wert verändert sich auch nach Eliminierung der partiellen *Mesostigma*-Sequenz nicht und ist wahrscheinlich auf die beschleunigte Evolutionsrate der Chlorophyten zurückzuführen. Die partiellen Sequenzen aus *Prymnesium* und *Pavlova* umfassen mit 234 bzw. 202 AS maximal 50% der vollständigen HDR (*Arabidopsis*, 468 AS), was möglicherweise zu artifiziellen Positionierungen in der phylogenetischen Analyse führen könnte. Daher wurde zusätzlich eine weitere Analyse ohne diese partiellen Haptophyten-Sequenzen durchgeführt. Die Topologie beider Stammbäume ist identisch, allerdings führt der Ausschluss der partiellen Sequenzen zu einer Erhöhung der statistischen Unterstützung für den Substammbaum I-b. Abbildung 30 zeigt die statistische Unterstützung der beiden Äste in der Analyse mit bzw. ohne die partiellen Haptophyten-Sequenzen. Gruppe I-b enthält die Sequenzen der Rhodophyta und der "Chromista" (Haptophyta, Diatomeen und Cryptophyta), welche zusammen gruppieren. Der gemeinsame Ursprung mit den Rotalgen wird mit 100% BP statistisch eindeutig unterstützt, was auf einen EGT im Rahmen der sekundären Endosymbiose hindeutet.

3.8.3 Ursprung der Gene des MEP-Wegs in den Plantae

Die phylogenetischen Analysen der Sequenzen der DXR (pla-2, Kap. 3.8.1) und der HDR (pla-7, Kap. 3.8.2) belegen den monophyletischen Ursprung dieser Sequenzen in Streptophyten, Rhodophyten sowie bei der HDR auch in den Glaucophyten. Ein cyanobakterieller Ursprung beider Gene wird statistisch eindeutig unterstützt, was sich durch einen EGT nach der primären Endosymbiose erklären lässt.

Ein cyanobakterieller Ursprung der DXS (pla-1), der MCT (pla-3), der CMK (pla-4) und der MECPS (pla-5) wird allerdings nicht unterstützt. Vielmehr scheint es sich bei der DXS um ein α -proteobakterielles Gen zu handeln, wie die mit einem Bootstrap-Wert von 100%

eindeutige Gruppierung der Eukaryoten zusammen mit den α -Proteobakterien nahe legt (Kap. 7.8, Abb. 39 und Abb. 40). Im Gegensatz dazu zeigen die MCT und die CMK eine deutliche Affinität zu den Sequenzen aus den Chlamydien, die zumindest bei der MCT statistisch mit 99% BP eindeutig unterstützt wird (Kap. 7.8, Abb. 41). Der Ursprung der MECPS innerhalb der bakteriellen Radiation wird nicht aufgelöst. Dies liegt wahrscheinlich an dem sehr langen gemeinsamen Ast der eukaryotischen Sequenzen (Kap. 7.8, Abb. 45 Substammbaum I), so dass auch dieses Gen möglicherweise analog zur DXR und HDR einen cyanobakteriellen Ursprung hat. Die Analyse der HDS (Kap. 7.8, Abb. 47 und Abb. 48) legt einen polyphyletischen Ursprung dieses Gens in den Streptophyten/Chlorophyten und den Rhodophyten nahe. Während die grüne Linie einen gemeinsamen Ursprung zusammen mit den Sequenzen aus den Chlamydien zu haben scheint und das Gen möglicherweise durch horizontalen Gentransfer erworben wurde, stammt das Gen aus den Rhodophyten sehr wahrscheinlich aus einem Cyanobakterium und wurde durch einen endosymbiotischen Gentransfer akquiriert. Auffällig an der Sequenz der HDS ist in diesem Zusammenhang eine ca. 300 AS große Insertion in der sonst stark konservierten Sequenz, die in der grünen Linie und in den Chlamydien vorhanden ist, in den Rotalgen und den Cyanobakterien jedoch fehlt (Alignment nicht gezeigt).

3.8.4 Die Sequenzen aus den Apicomplexa lassen keine eindeutige phylogenetische Zuordnung zu

Zum Superensemble der Alveolata werden die (bis auf die aplastidäre Gattung *Cryptosporidium*) plastidären Apicomplexa (z. B. *Plasmodium*) und die Dinophyta gezählt, sowie die Perkinsea und die aplastidären Ciliaten. Die heterotrophen Ciliaten verfügen ausschließlich über den cytosolischen MVA-Weg (Kap. 3.5.2), und es konnten keine Sequenzen für Gene des plastidären Wegs aus dieser Gruppe identifiziert werden. Im Gegensatz dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit durch *in silico*-Analysen die Sequenzen aller Gene des plastidären MEP-Wegs bis auf die MCT (pla-3) aus den Apicomplexa (Kap. 3.5.1) etabliert. Darüber hinaus wurde eine vollständige Sequenz für die DXR (pla-2) aus dem Dinophyten *Pyrocystis lunula* (Kap. 3.5.3) sowie partielle Sequenzen von verschiedenen Genen des MEP-Wegs durch *in silico*-Analysen aus den Dinophyten *Alexandrium tamarense*, *Amphidinium carterae*, *Heterocapsa triquetra* und *Karlodinium micrum* etabliert (Kap. 3.5.4) und in die phylogenetische Analyse einbezogen. Es konnten keine Gene für die HDS (pla-6) und die HDR (pla-7) aus Dinophyten etabliert werden. Die anderen fünf Gene zeigen in den phylogenetischen Analysen durchgängig eine eindeutige

Assoziation der jeweiligen Sequenzen aus den Dinophyten mit den Genen der "Chromista", die bei der MECPS mit 100% BP (Kap. 7.8, Abb. 46) eindeutig belegt wird. Aufgrund der sehr hohen Evolutionsrate der Apicomplexa, die in einer starken Divergenz der Sequenzen und dadurch möglicherweise in LBA resultiert, ist der phylogenetische Ursprung der Gene aus diesen Organismen schwer zu bestimmen. Es lässt sich jedoch eine gemeinsame Gruppierung der Sequenzen der DXS (pla-1) und der DXR (pla-2) zusammen mit den Rhodophyten und den "Chromista" beobachten, die mit Bootstrap-Werten von 75% (DXR, Kap. 3.8.1, Abb. 28) und 96% (DXS, Kap. 7.8, Abb. 40) eine solide statistische Unterstützung erhält. Die Sequenzen der HDS (pla-6) aus den Apicomplexa gruppieren ebenso wie die "Chromista" zusammen mit den paralogenen Genen der Streptophyten und Chlorophyten (Kap. 7.8, Abb. 47 und Abb. 48) und haben damit einen "grünen" Ursprung, was auch bereits für die Phosphoribulokinase (PRK) aus diesen Organismen beobachtet wurde (Petersen *et al.* 2006a). Die Sequenz der HDR (pla-7) evolviert verhältnismäßig langsam und gruppiert mit starker statistischer Unterstützung (97% BP; Kap. 3.8.2, Abb. 29) zusammen mit den Chlamydien, was einen polyphyletischen Ursprung dieses Gens in den Apicomplexen und in den restlichen Eukaryoten nahe legt. Die Gene für die CMK (pla-4) und die MECPS (pla-5) zeigen eine sehr starke Beschleunigung der Evolutionsrate und gruppieren - möglicherweise aufgrund von LBA-Effekten - statistisch nicht unterstützt innerhalb der prokaryotischen Radiation.

3.8.5 Monophyletischer Ursprung der Gene für den plastidären MEP-Weg in den "Chromista"

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnten die Sequenzen für alle sieben Gene des plastidären MEP-Wegs aus den Diatomeen (Stramenopilen) *Phaeodactylum tricornutum* und *Thalassiosira pseudonana* (Kap. 3.5.6) sowie aus dem Haptophyten *Emiliania huxleyi* (Kap. 3.5.10) etabliert werden. Darüber hinaus wurden aus den Haptophyten eine vollständige Sequenz einer DXR aus *Prymnesium parvum* sowie partielle Sequenzen einer DXS aus *Pavlova lutheri* und der HDR aus beiden Organismen etabliert (Kap. 3.5.9) und in die phylogenetischen Analysen einbezogen. Die Sequenzen der Diatomeen bzw. der Haptophyten gruppieren jeweils mit starker statistischer Unterstützung zusammen und belegen so den gemeinsamen Ursprung der Gene.

Analog zu den Genen des cytosolischen MVA-Wegs (Kap. 3.7.5) zeigen auch die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Gene für die Enzyme des plastidären MEP-Wegs aus den Diatomeen (Stramenopilen) und aus den Haptophyten bei sechs von sieben Genen (DXS, DXR, MCT, MECPS, HDS, HDR) einen gemeinsamen Ursprung dieser beiden

3 Ergebnisse

Algengruppen, der überwiegend statistisch solide unterstützt wird (Kap. 3.8.1, Abb. 27; Kap. 3.8.2, Abb. 30; Kap. 7.8, Abb. 40, 42, 46 und 48). Die Sequenzen des siebten Gens, der CMK (pla-4), aus den beiden Abteilungen gruppieren zusammen mit der partiellen Sequenz aus dem Fucoxanthin-haltigen Dinophyten *Karlodinium* und mit *Parachlamydia* (Kap. 7.8, Abb. 43, Abb. 44), die phylogenetischen Verhältnisse sind auch nach der Eliminierung der partiellen Sequenz aus dem Dinophyten nicht eindeutig aufgelöst. Möglicherweise hat *Parachlamydia* die CMK jedoch durch HGT von einem Eukaryoten erworben, und dann würde auch der siebte Marker des MEP-Wegs einen gemeinsamen Ursprung der Sequenzen aus Diatomeen und Haptophyten belegen.

Auch die Cryptophyten, vertreten durch die vollständige Sequenz der DXR (pla-2) aus *Hanusia phi* und die partielle Sequenz der HDR (pla-7) aus *Guillardia theta* (Kap. 3.5.8), gruppieren zusammen mit den Sequenzen der Haptophyten und Stramenopilen, was bei der DXR mit einem Bootstrap-Wert von 100% eindeutig bestätigt wird (Kap. 3.8.1, Abb. 27-B). Die Phylogenien legen damit einen monophyletischen Ursprung dieser Sequenzen aus den drei Gruppen der "Chromista" nahe.

Der Ursprung der Gene für den MEP-Weg in den "Chromista" liegt anhand der hier gezeigten Phylogenien mit Ausnahme der HDS (pla-6) innerhalb der Rhodophyta, sie wurden im Kontext der sekundären Endosymbiose erworben. Die HDS der Haptophyta, der Stramenopilen und der Apicomplexa hat einen gemeinsamen "grünen" Ursprung analog zur Phosphoribulokinase (PRK, Petersen *et al.* 2006a).

3 Ergebnisse

4 Diskussion

4.1 Multiple Entstehung und heterogene Verteilung der plastidären GPI

Die Glucose-6-Phosphat Isomerase (GPI) ist ein essentielles Enzym der Glykolyse und der Gluconeogenese und kommt in allen photosynthetischen und heterotrophen Eukaryoten, in Eubakterien und einigen Archaea vor (Kap. 3.3.7, Abb. 17). Landpflanzen enthalten ein plastidär lokalisiertes Homolog, welches für die Produktion und den Abbau von Stärke in diesem Organell sowie für den Oxidativen Pentose-Phosphat Pathway (OPPP; Martin und Herrmann 1998) essentiell ist. Das entsprechende Gen wurde nach der primären Endosymbiose aus dem cyanobakteriellen Vorläufer des Plastiden erworben (Abb. 17; Nowitzki *et al.* 1998). Im Gegensatz dazu fehlt dieses cyanobakterielle Homolog in den vollständig sequenzierten Genomen der Chlorophyten *Chlamydomonas reinhardtii* und *Volvox carteri* sowie der Rotalgen *Cyanidioschyzon merolae* und *Galdieria sulphuraria*. Die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Daten legen die Schlussfolgerung nahe, dass das cyanobakterielle Gen innerhalb der Plantae erst sehr spät in der Evolution und nur ein einziges Mal in der Linie der Landpflanzen durch endosymbiotischen Gentransfer in den Kern der Wirtszelle transferiert wurde. Durch *in silico* Analysen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Chloro- und Rhodophyten dennoch plastidär lokalisierte GPI enthalten, die allerdings aus dem cytosolischen Gen durch den Erwerb eines Transit-Peptides entstanden sind (Kap. 3.3.7.1, Abb. 19; Kap. 3.3.5, Abb. 13). Die distinkte Gruppierung der plastidären GPI der Chlorophyten zusammen mit dem cytosolischen Homolog aus den Streptophyten wird statistisch mit 100% BP unterstützt und belegt damit den gemeinsamen Ursprung dieser Sequenzen. Chlorophyten könnten somit die plastidäre GPI unabhängig durch eine Genduplikation ihrer cytosolischen Isoform rekrutiert haben. Der evolutive Ursprung der plastidären GPI der Rotalgen sowie der beiden Gene aus dem Glaucophyten *Cyanophora* wird nicht aufgelöst. In den Chlorophyten ging die cytosolisch lokalisierte Form im Anschluss an die Duplikation verloren, wie auch bereits für die Gene der cytosolischen Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase (FBA) und der Fructose-1,6-Bisphosphatase (FBP) in *Chlamydomonas* berichtet (Schnarrenberger *et al.* 1994, Teich *et al.* 2006). Diese Feststellung deckt sich mit biochemischen Untersuchungen, nach denen zumindest der C6-Teil der Glykolyse bei Chlorophyten im Plastiden abläuft, und nicht - wie bei höheren Landpflanzen - im Cytosol (Schnarrenberger *et al.* 1990, Plaxton 1996). Der unabhängige Erwerb einer plastidären GPI durch Rekrutierung der cytosolischen Form in den Chlorophyten, Rhodophyten, und

möglicherweise auch in den Glaucophyten zeigt die essentielle Bedeutung für den plastidären Stoffwechsel dieser Organismen. Die GPI der Chlorophyten wird ebenso wie das plastidäre Homolog der Landpflanzen für die Stärkesynthese in den Plastiden benötigt. Im Gegensatz dazu findet in Rhodophyten der Aufbau dieser Speichersubstanz außerhalb des Plastiden statt (Viola *et al.* 2001); die hauptsächliche Funktion der plastidären GPI der Rotalgen liegt daher wahrscheinlich im OPPP.

Die Abwesenheit einer plastidären GPI in *Emiliania huxleyi* deutet auf grundlegende Veränderungen des plastidären Stoffwechsels der Haptophyten nach der sekundären Endosymbiose hin, einschließlich des Verlustes des OPPP. Das Fehlen dieses Stoffwechselwegs wurde bereits in den Diatomeen nachgewiesen (Michels *et al.* 2005). Es korreliert mit der Substitution der plastidären Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GapA) des Rotalgen-Endosymbionten durch ein cytosolisches Isoenzym (GapC-I) (Liaud *et al.* 1997, Liaud *et al.* 2000, Harper und Keeling 2003). Dieses kann - im Gegensatz zur GapA - nicht die Inaktivierung des Calvin Zyklus in der Nacht vermitteln, weshalb es bei zusätzlicher Anwesenheit des OPPP zu einem ständigen, physiologisch nutzlosen Auf- und Abbau von ATP käme (Michels *et al.* 2005). Die GapC-I ist in allen Abteilungen der komplexen Algen mit roten Plastiden vorhanden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass der plastidäre OPPP sowie die dafür essentielle GPI nach der sekundären Endosymbiose nicht nur in Haptophyten und Diatomeen, sondern auch in Cryptophyten und Dinophyten verloren ging.

Umso auffälliger ist das Vorkommen von vier unabhängigen GPI-Genen in den Diatomeen. Eine vergleichbare Redundanz wurde auch für weitere Gene des Primärstoffwechsels wie die FBA, die FBP und die Pyruvat Kinase (PYK) nachgewiesen (Kroth *et al.* 2005, Teich *et al.* 2006; Río Bártulos persönliche Mitteilung). Die GPI-3 der Diatomeen (Kap. 3.3.7.1, Abb. 19) gruppiert in der phylogenetischen Analyse zusammen mit den plastidären Sequenzen der Rhodophyten, was ihre Herkunft durch endosymbiotischen Gentransfer nahe legt. Das im Rahmen dieser Arbeit durch RT-PCR-Amplifikation nachgewiesene putative Signal-Transit-Peptid aus *Phaeodactylum* (Kap. 3.3.7.2) impliziert einen Transport des Genprodukts in den komplexen Plastiden. Wahrscheinlich war diese Isoform vor dem Verlust des OPPP im Plastiden aktiv. Eventuell dienen die verschiedenen Gene auch einer differenzierteren Regulation der GPI-Aktivität, oder sie sind in anderen Stoffwechselwegen involviert, wie z. B. einer mitochondrialen Glykolyse. Deren Existenz in Stramenopilen (Diatomeen und Oomyceten) wurde für den C3-Teil (ausgehend von Triosephosphat bis zur Bildung von Pyruvat) bereits nachgewiesen (Liaud *et al.* 2000; Río Bártulos persönliche Mitteilung).

4.2 Die cytosolische GPI als Marker der Wirtszelle - Implikationen für die Evolution der Algen

Neben der GAPDH und der FBA, die beide ausgiebig charakterisierte Gene des Primärstoffwechsels sind, sollte die GPI einen geeigneten Marker für die Rekonstruktion der organismischen Evolution darstellen. Phylogenetische Analysen dieses Gens haben bereits in früheren Arbeiten Erkenntnisse über spezifische Verwandtschaftsverhältnisse wie z. B. die Assoziation des Apicomplexen *Toxoplasma* mit den Landpflanzen/Chlorophyten gebracht (Dzierszinski *et al.* 1999). Als Erklärung für eine offenbar enge verwandtschaftliche Beziehung zwischen γ -Proteobakterien und Metazoen wurde ein horizontaler Gentransfer von Eukaryoten zu Prokaryoten postuliert (Katz 1996). Diese Interpretation wurde jedoch sehr kontrovers diskutiert, sie beruht wahrscheinlich auf einer zu geringen Anzahl analysierter Taxa, bedingt durch die zur damaligen Zeit noch nicht verfügbaren Sequenzen (Nowitzki *et al.* 1998). Inzwischen stehen aufgrund einer Vielzahl von Genomprojekten GPI-Sequenzen aus allen Abteilungen der Prokaryoten sowie aus vielen Metazoen und Fungi zur Verfügung.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich eine große Anzahl eukaryotischer Sequenzen aus Vertretern der Plantae (*Mesostigma viride*, Chlorophyta, Rhodophyta und dem Glaucophyt *Cyanophora paradoxa*), den Alveolata (Dinophyta, Apicomplexa, *Perkinsus* und Ciliaten) und der "Chromista" (Haptophyta, Stramenopile und Cryptophyta) etabliert. Sie repräsentiert die bisher umfassendste Analyse von GPI-Sequenzen (Kap. 3.3.7, Abb. 19).

Die stark unterstützte gemeinsame Gruppierung der Plantae zusammen mit den Alveolata und den Stramenopilen zur Gruppe I-B (Abb. 17) ist ein auffälliges Ergebnis der Analysen. Der sehr lange Ast dieser Gruppe entspringt ebenso wie die übrigen eukaryotischen GPI aus der eubakteriellen Radiation, eine mögliche Assoziation zu anderen Organismen wird nicht aufgelöst. Es lassen sich drei mögliche Szenarien für diese Verteilung der GPI aufstellen.

Erstens könnte es eine Duplikation des GPI-Gens früh in der eukaryotischen Evolution gegeben haben, gefolgt von Linien-spezifischen Verlusten je einer der beiden Kopien. Mit Ausnahme der Diatomeen, deren vier unabhängige GPI-Sequenzen auf die beiden Sub-Gruppen I-A und I-B verteilt sind, würden es sich in diesem Falle bei den Sequenzen aller anderen Eukaryoten um paraloge Gene handeln.

Zweitens könnten eine oder mehrere der Linien aus I-B ihre GPI durch horizontalen Gentransfer (HGT) erworben haben, und der lange Ast dieser Gruppe spiegelt die Evolution der Donor-Zelle wider. In diesem Falle wären sämtliche mit diesem Donor nahe

verwandten Spezies entweder ausgestorben, oder ihre GPI wurde bisher nicht identifiziert.

Drittens stellt die Phylogenie der GPI möglicherweise die tatsächliche organismische Evolution dar. Der distinkte Ast der Alveolata, in dem Dinophyten und Ciliaten jeweils eine starke statistische Unterstützung erhalten, deckt sich mit 18S rDNA Analysen (van de Peer und De Wachter 1997), ebenso wie die Positionierung von *Perkinsus* (Reece *et al.* 1997), die in neueren Analysen auch für Strukturgene wie Actin und Tubulin als basal zu den Dinophyten bestätigt wurde (Saldarriaga *et al.* 2003, Leander und Keeling 2004). Die Assoziation der Alveolaten mit den Stramenopilen wurde ebenfalls durch 18S rDNA-Analysen belegt (van de Peer und De Wachter 1997), darüber hinaus auch die Gruppierung dieser beiden Linien mit den Plantae zum Ausschluss der Metazoa und Fungi (Opisthokonta) durch umfassende Analysen von konkatenierten Datensätzen der Wirtszellen (Rodríguez-Ezpeleta *et al.* 2005). Die hier gezeigten Daten für die GPI stimmen mit diesen bisherigen Erkenntnissen über die organismische Evolution der Eukaryoten überein, sie kann daher als ein Marker der Wirtszelle angesehen werden. Möglicherweise gab es eine beschleunigte Evolutionsrate der GPI früh in der Entstehung der Gruppe I-B, welche als "glückliches" Ereignis der heutigen Phylogenetik erlaubt, diesen Aspekt der eukaryotischen Evolution anhand eines einzigen Wirtszellmarkers aufzulösen.

Unabhängig davon, welches Szenario zutrifft, lassen sich die verwandtschaftlichen Verhältnissen zwischen den Eukaryoten der Gruppen I-B und I-A (Abb. 17) nicht auflösen. Möglicherweise haben sie einen gemeinsamen mitochondrialen/ α -proteobakteriellen Ursprung, wie er für die gesamte Glykolyse vorhergesagt wurde (Martin und Schnarrenberger 1997). Die von Katz (1996) beobachtete Gruppierung von γ -Proteobakterien und Metazoen zum Ausschluss der Fungi jedoch kann in der hier vorliegenden umfassenden Analyse nicht bestätigt werden; der postulierte HGT von Eukaryoten zu Prokaryoten beruht dementsprechend sehr wahrscheinlich auf der Fehlinterpretation einer korrekten, allerdings unvollständigen phylogenetischen Analyse. Die GPI als Wirtszell-Marker ist prinzipiell nicht dazu geeignet, Aussagen über einen möglichen "grünen" oder "roten" Ursprung des Apicoplasten zu treffen, wie er bisher kontrovers diskutiert wird (Funes *et al.* 2002, Waller *et al.* 2003, Funes *et al.* 2003). Diesbezügliche Spekulationen von Dzierszinski *et al.* (1999) aufgrund der "grünen" Assoziation von *Toxoplasma* lassen sich, wie schon bei Katz (1996), auf ein unzureichendes Taxon Sampling zurückführen, da Sequenzen aus Rotalgen, Glaucophyten und Stramenopilen bis *dato* nicht verfügbar waren. Die hier vorliegende umfassende Analyse zeigt, dass es sich bei der GPI aus *Toxoplasma* um das ursprüngliche Gen der Alveolaten-Wirtszelle handelt.

Die in dieser Arbeit etablierten GPI-Sequenzen aus Vertretern aller Gruppen der komplexen Algen mit roten Plastiden (Haptophyta, Diatomeen, Cryptophyta und Peridininhaltigen Dinophyta) sollte einen Vergleich ihrer Verwandtschaftsverhältnisse im Bezug auf die Wirtszelle ermöglichen. Bisherige Analysen von plastiden-spezifischen Markern des Calvin Zyklus deuten stark auf einen gemeinsamen Ursprung der Plastiden dieser Gruppen in einer einzigen sekundären Endosymbiose mit einer Rotalge hin (Harper und Keeling 2003, Patron *et al.* 2004, Petersen *et al.* 2006a, Teich *et al.* 2006), allerdings gibt es bisher keinerlei Wirtszell-Marker, die diese Annahme unterstützen (diskutiert in Bodyl 2005, Teich *et al.* 2006). Die hier vorliegende Sub-Analyse der Gruppe I-A zeigt eine solide statistische Unterstützung für die gemeinsame Gruppierung von Haptophyten und Diatomeen (GPI-4) von 74/77% BP (Kap. 3.3.7., Abb. 18). Haptophyten besitzen nur eine einzige GPI, wohingegen Diatomeen über vier unabhängige Gene verfügen, und die einzige GPI aus dem nicht-photosynthetischen Stramenopilen *Phytophthora* gehört zur Subgruppe I-B, in der auch die GPI-1, -2 und -3 der Diatomeen gruppieren (Abb. 17). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass Diatomeen ihre GPI-4 durch einen horizontalen Gentransfer (HGT) von den Haptophyten erworben haben. Des Weiteren gruppiert die GPI des Cryptophyten *Hanusia* eindeutig zusammen mit den Sequenzen aus den Chlamydiales auf einem distinkten und mit 100% BP unterstützten Ast (Abb. 17 Gruppe I-C), zum Ausschluss aller anderen Sequenzen. Eine bakterielle Kontaminante kann anhand der fast vollständigen Übereinstimmung der Sequenz aus *Hanusia phi* mit einem unabhängig isolierten Klon aus *Guillardia theta* ausgeschlossen werden. Ungeachtet der ursprünglichen Herkunft dieses Genes haben Cryptophyten ihre GPI unabhängig von den Vertretern anderer komplexer Algen mit rotem Plastiden erworben.

Auch unter Berücksichtigung eines möglichen linienspezifischen differentiellen Verlustes (s. o.) bietet die Phylogenie der GPI keine Hinweise auf den gemeinsamen Ursprung der Wirtszellen der als "Chromista" zusammengefassten Haptophyta, Diatomeen und Cryptophyta sowie der Alveolata und unterstützt folglich nicht die Chromalveolat-Hypothese (Cavalier-Smith 1999, Kap. 1.3). Die Verbreitung der GPI innerhalb der komplexen Algen spricht vielmehr für einen polyphyletischen Ursprung ihrer Wirtszellen. Eventuell könnten auch tertiäre Endosymbiosen zu der heutigen Phylogenie beigetragen haben, wie bereits für andere wirtszellspezifische Marker postuliert (Petersen *et al.* 2006b, Teich *et al.* 2006). Derartige Ereignisse bieten auch eine mögliche Erklärung für die in dieser Arbeit erstellten Phylogenien einiger Gene für den cytosolischen MVA-Weg der IPP-Biosynthese (Kap. 4.5).

4.3 Existenz des MVA-Wegs in *Mesostigma* und *Cyanophora* - Implikationen für die ursprüngliche Verbreitung des Pathways in den Plantae

Die erfolgreiche Amplifikation von zehn Genen für die IPP-Biosynthese aus der Grünalge *Mesostigma viride* im Rahmen dieser Arbeit (Kap. 3.4.3) liefert wichtige Erkenntnisse über die Evolution von Grünalgen und Landpflanzen. Vor allem die Präsenz der HMGS (cyt-1), HMGR (cyt-2) und MDD (cyt-5) aus dem cytosolischen MVA-Weg ist bemerkenswert, da es sich hierbei um die ersten Sequenzen des MVA-Wegs aus Grünalgen überhaupt handelt. Sowohl die vollständig sequenzierten Chlorophyceen *Chlamydomonas reinhardtii* und *Volvox carteri* wie auch die beiden nahe verwandten Prasinophyceen *Ostreococcus tauri* und *O. lucimarinus* verfügen nicht über Gene für Enzyme dieses Stoffwechselwegs (NCBI, JGI). Diese Ergebnisse sind kompatibel mit Markierungsexperimenten mit ¹³C-Glucose (Schwender *et al.* 2001), die auf die Abwesenheit des MVA-Wegs in allen vier Gruppen der Chlorophyta (Prasino-, Ulvo-, Trebouxio- und Chlorophyceen) hindeuten. Im Gegensatz dazu wurde von Schwender und Mitarbeitern aufgrund der Markierungsexperimente die Präsenz des MVA-Wegs in zwei Charophyceen (*Spirogyra* und *Klebsormidium*) postuliert, die erstmals durch die in dieser Arbeit etablierten HMGS-Sequenzen aus *Chara vulgaris* (Kap. 3.4.2) nachgewiesen wurde. Die Hinweise der Markierungsexperimente auf das Vorkommen des MVA-Wegs in *Mesostigma* waren für Schwender und Kollegen (2001) schwierig zu interpretieren, da diese Grünalge ursprünglich als Prasinophycee klassifiziert worden war (Mattox und Stewart 1984). Nachdem die evolutive Zugehörigkeit von *Mesostigma* lange kontrovers diskutiert wurde (zusammengefasst in McCourt *et al.* 2004), konnte die phylogenetische Schlüsselstellung als ursprünglicher Streptophyt an der Basis der Charophyten und Landpflanzen inzwischen bestätigt werden (Melkonian 1989, Petersen *et al.* 2006b, Rodríguez-Ezpeleta *et al.* 2006). Die Präsenz des MVA-Wegs in *Mesostigma* (diese Arbeit, Schwender *et al.* 2001) untermauert diese Klassifizierung und deutet außerdem darauf hin, dass es sich bei dem cytosolischen MVA-Weg der IPP-Biosynthese um ein allgemeines, charakteristisches Merkmal der Streptophyta handelt. Seine Abwesenheit in allen anderen Linien der Grünalgen, inklusive der "primitiven" Prasinophyceen (Rodríguez-Ezpeleta *et al.* 2006), legt einen einzigen Verlust in einem gemeinsamen Vorfahren der heutigen Chlorophyta nahe, wie in Abbildung 31 dargestellt. Der Verlust dieses Wegs ist analog zur Abwesenheit der cytosolischen Glykolyse (diese Arbeit, Schnarrenberger *et al.* 1990, Teich *et al.* 2006) ein weiteres Beispiel für eine weitreichende Reduktion des cytosolischen Primärstoffwechsels in den Chlorophyten.

4 Diskussion

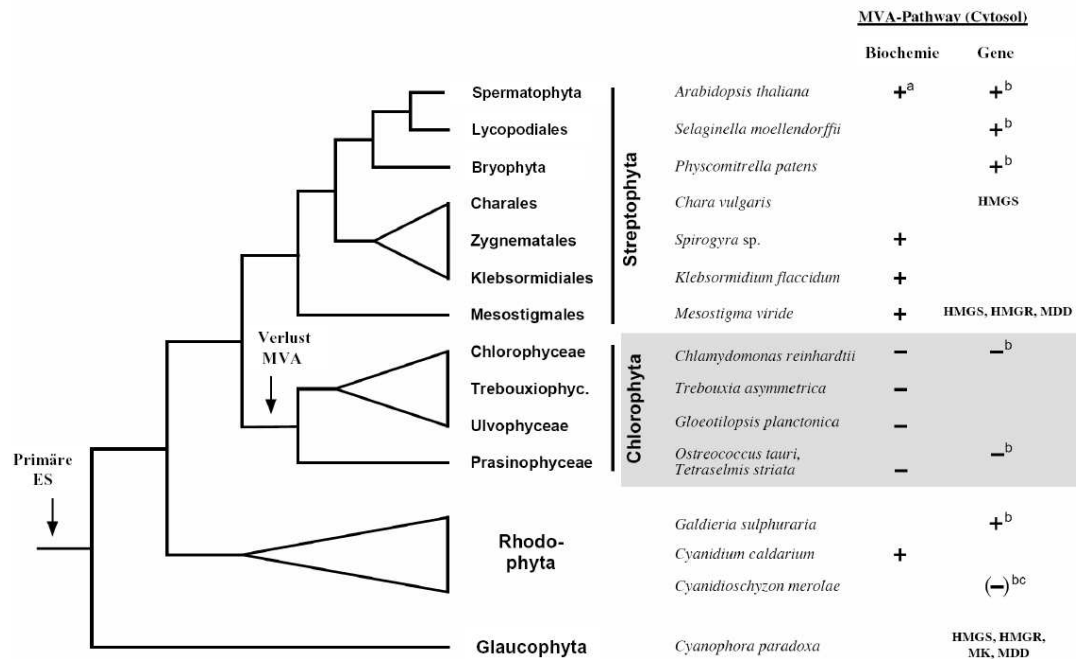


Abb. 31: Verbreitung des cytosolischen MVA-Pathways in den Plantae. + bzw. -: Präsenz bzw. Abwesenheit des Pathways wie durch ¹³C-Markierungsexperimente bzw. durch molekulare Daten nachgewiesen. **a:** für verschiedene Landpflanzen wie *Lemna gibba*, *Daucus carota* und *Hordeum vulgare* nachgewiesen (Lichtenthaler *et al.* 1997b). **b:** Genomsequenzierungs-Daten. **c:** nur HMGS (cyt-1) vorhanden. **ES:** Endosymbiose. **Grau unterlegt:** Abwesenheit des cytosolischen MVA-Wegs in den Chlorophyta.

Bei den Rhodophyta deuten Markierungsexperimente auf das Vorkommen sowohl des cytosolischen MVA- als auch des plastidären MEP-Wegs in *Cyanidium caldarium* hin (Disch *et al.* 1998b). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die genomischen Sequenzen aller zwölf Gene für den MVA- und den MEP-Weg sowie zusätzlich einige EST-Sequenzen aus dem Genom-Sequenzierungsprojekt der Rotalge *Galdieria sulphuraria* etabliert (Kap. 3.4.5), was das generelle Vorkommen beider Stoffwechselwege in den Rotalgen belegt. Die Abwesenheit der cytosolischen Gene außer der HMGS (cyt-1) im Genom von *Cyanidioschyzon merolae* (Kap. 3.4.5) repräsentiert möglicherweise einen unabhängigen, linienspezifischen sekundären Verlust des cytosolischen MVA-Wegs in dieser reduzierten extremophilen Rotalge (Matsuzaki *et al.* 2004).

Letztlich spricht die erfolgreiche Amplifikation von vier der fünf cytosolischen Gene aus dem Glaucophyten *Cyanophora paradoxa* im Rahmen dieser Arbeit (HMGS, HMGR, MK, MDD, Kap. 3.4.3) für eine ursprünglich universelle Verbreitung des cytosolischen MVA-Pathways der IPP-Biosynthese in allen Gruppen der Plantae (Abb. 31). Wahrscheinlich handelt es sich um den ursprünglichen Syntheseweg der Wirtszelle der primären Endosymbiose, wohingegen der plastidäre MEP-Weg im Zuge der Endosymbiose aus dem cyanobakteriellen Endosymbionten übernommen wurde (Lange *et al.* 2000).

4.4 Der MEP-Weg als plastidärer Marker unterstützt einen monophyletischen Ursprung der Plastiden der "Chromista"

Die funktionelle Reduktion des Plastiden der Apicomplexa (Apicoplasten) geht einher mit einer reduzierten Genausstattung dieses Organells. Bis heute konnte der evolutive Ursprung des Apicoplasten in einer Grünalge bzw. einer Rotalge nicht eindeutig bestimmt werden (Funes *et al.* 2002, Waller *et al.* 2003, Funes *et al.* 2003). Die Existenz des plastidären MEP-Pathways der IPP-Biosynthese in den Vertretern dieser Organismengruppe, wie z. B. dem Malariaerreger *Plasmodium*, bietet die Möglichkeit, plastidäre Sequenzen aus diesen Organismen in phylogenetische Analysen einzubeziehen. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Sequenzen aller Gene für Enzyme des plastidären MEP-Wegs aus verschiedenen plastidären Vertretern der Apicomplexa phylogenetisch analysiert (Kap. 3.8.4). Diese parasitisch lebenden Organismen zeigen allerdings eine im Allgemeinen stark erhöhte Evolutionsrate, die sich in extrem langen Ästen wie z. B. in der Analyse der DXR (Kap. 3.8.1, Abb. 27) äußert. Dies führt bei den phylogenetischen Analysen möglicherweise zur Ausbildung von "long branch attraction" (LBA) -Effekten, so dass sich über die originäre evolutive Herkunft der Gene keine abgesicherte Aussage treffen lässt. Ein gemeinsamer Ursprung zusammen mit Sequenzen aus den "Chromista" wird jedoch nicht ausgeschlossen und spräche für einen "roten" Ursprung des Apicoplasten.

Die Analysen der Sequenzen des plastidären MEP-Wegs (Kap. 3.8) belegen eindeutig einen gemeinsamen Ursprung der Plastiden der "Chromista" und der Dinophyten. Neben Enzymen aus dem Calvin Zyklus (Teich *et al.* 2006) belegt somit dieser unabhängige plastidäre Stoffwechselweg vollständig die Monophylie der daran beteiligten Gene in diesen Organismen. Eine geradezu modellhafte Evolution zeigt die DXR (pla-2), die ursprünglich aus dem cyanobakteriellen Vorläufer des Plastiden in der primären Endosymbiose stammt und anschließend über zwei Endosymbiosen hinweg in das jeweilige Wirtszellgenom transferiert wurde (Kap. 3.8.1, Abb. 26). Der Ursprung der Gene für den MEP-Weg in den "Chromista" liegt anhand der hier gezeigten Phylogenien bei sechs der sieben Gene (DXS, DXR, MCT, CMK, MECPS, HDR) innerhalb der Rhodophyta, sie wurden durch endosymbiotischen Gentransfer (EGT) aus dem Rotalgen-Plastiden transferiert. Das siebte Gen, die HDS (cyt-6), zeigt analog zur Phosphoribulokinase (PRK, Petersen *et al.* 2006a) einen "grünen" Ursprung und wurde durch einen horizontalen Gentransfer (HGT) erworben (Kap. 7.8, Abb. 47).

4.5 Phylogenie des MVA-Wegs - Implikationen für die Evolution der komplexen Algen

Die Stammbäume der in dieser Arbeit analysierten Gene für Enzyme des cytosolischen MVA-Wegs für die IPP-Biosynthese spiegeln bezüglich der Streptophyta, der Fungi und der Metazoa die organismische Evolution innerhalb der Eukaryoten wider. Die phylogenetischen Analysen der PMK (cyt-4) und der MDD (cyt-5) lassen jedoch aufgrund der unzureichenden Anzahl verfügbarer Sequenzen und der teilweise sehr unterschiedlichen Evolutionsraten der einzelnen Gene kaum Aussagen über die verwandtschaftlichen Verhältnisse innerhalb der verschiedenen in dieser Arbeit untersuchten Organismengruppen zu. Im Gegensatz dazu zeigen sowohl die Phylogenien der HMGS (cyt-1) als auch der HMGR (cyt-2) und - trotz eines unvollständigen Taxon Samplings - auch der MK (cyt-3) eine gute Auflösung und stellen deshalb geeignete Marker für die Analyse der Gene aus den verschiedenen Algengruppen dar.

Die Gene aus den Stramenopilen (Diatomeen und Oomyceten) zeigen die erwartete Monophylie, wobei die Sequenz der MK aus *Thalassiosira* wahrscheinlich sekundär durch horizontalen Gentransfer (HGT) erworben wurde (Kap. 7.8, Abb. 34). Darüber hinaus zeigen die hier vorliegenden Analysen überraschenderweise einen statistisch eindeutig unterstützten gemeinsamen Ursprung der Sequenzen der HMGS aus den Stramenopilen und dem Haptophyten *Emiliana* (Kap. 3.7, Abb. 24 und Abb. 25). Die MK aus *Emiliana* gruppiert ebenfalls eindeutig zusammen mit den Sequenzen aus den Oomyceten (Kap. 7.8, Abb. 35). Die Topologien legen jeweils einen photosynthetischen, Rotalgen-assoziierten Ursprung dieser Gene nahe. Die Möglichkeit einer bereits photosynthetischen Wirtszelle der sekundären Endosymbiose wird von Nozaki *et al.* (2003) aufgrund von umfassenden phylogenetischen Analysen ausgeschlossen. Eine plausible Erklärung für die Assoziation der Stramenopilen und Haptophyten zusammen mit den Rotalgen ist ein endosymbiotischer Gentransfer (EGT) aus dem eukaryotischen Endosymbionten zur sekundären Wirtszelle im Verlauf einer sekundären Endosymbiose, wobei die ursprünglichen Gene (HMGS, MK) der Wirtszelle verloren gingen ("endosymbiotic gene replacement"). Im Rahmen dieses Szenarios bietet die Präsenz der MVA-Gene in den heterotrophen Oomyceten (Kap. 3.5.6) einen indirekten Hinweis auf einen photosynthetischen Ursprung dieser Organismen sowie einen sekundären Verlust ihres Plastiden. Diese Annahme ist kongruent mit erst kürzlich veröffentlichten Analysen der Genome der Oomyceten *Phytophthora sojae* und *P. ramorum*, die demzufolge über 800 Gene mit Homologien zu sonst für photosynthetische Organismen spezifischen Genen enthalten (Tyler *et al.* 2006).

Eine gemeinsame Gruppierung der HMGR (cyt-2) von *Emiliania* zusammen mit den Sequenzen aus den Stramenopilen wird statistisch nur schwach unterstützt (Kap. 7.8, Abb. 33), und die Sequenzen der MDD (cyt-5) aus Haptophyten und Stramenopilen zeigen keine gemeinsame Gruppierung (Kap. 7.8, Abb. 38). Die hier vorliegenden Analysen geben folglich keine Hinweise für einen gemeinsamen Ursprung der Wirtszellen der Stramenopilen und der Haptophyten in einer gemeinsamen sekundären Endosymbiose. Sie bieten daher, wie auch schon die cytosolische GPI als Marker der Wirtszelle (Kap. 3.3, Kap. 4.2), keine Unterstützung für die umstrittene Chromalveolat-Hypothese (Cavalier-Smith 1999).

Eine mögliche Erklärung für die Entstehung der verschiedenen Gruppen der komplexen Rotalgen (Haptophyta, Diatomeen, Cryptophyta und Dinophyta) ist eine einzige sekundäre Endosymbiose gefolgt von anschließenden tertiären und möglicherweise auch quartären Endosymbiosen (Delwiche 1999, Bachvaroff *et al.* 2005, Petersen *et al.* 2006a, Teich *et al.* 2006). Derartige Endosymbiose-Ereignisse sind dokumentiert für verschiedene Gruppen der Dinophyten, die unabhängig durch die Rekrutierung von Haptophyten, Diatomeen oder Cryptophyten zu komplexen Plastiden entstanden sind (Chesnick *et al.* 1997, Tengs *et al.* 2000, Hackett *et al.* 2003). Eine derartige tertiäre Endosymbiose könnte auch eine mögliche Erklärung für die gemeinsame Gruppierung der HMGS (cyt-1), der HMGR (cyt-2) und der MK (cyt-3) aus Haptophyten und Stramenopilen bieten. Möglicherweise kam es im Rahmen einer solchen tertiären Endosymbiose zu endosymbiotischen "gene replacements", wobei Gene aus dem tertiären Endosymbionten in das Genom des tertiären Wirts transferiert wurde und dort das ursprüngliche Wirtsgen ersetzt. Zur Aufklärung der Beziehungen aller "Chromista" auf Wirtszellebene ist es jedoch unabdingbar, zukünftig auch noch Sequenzen von Vertretern der Cryptophyten zu etablieren und in die phylogenetischen Analysen mit einzubeziehen.

Der aufgrund molekularer Marker gesicherte gemeinsame Ursprung der Alveolata (Gajadhar *et al.* 1991, Budin und Philippe 1998) spiegelt sich in den Analysen der Gene des cytosolischen MVA-Wegs nicht wider. Apicomplexa und Perkinsea verfügen ausschließlich über Gene für den plastidären MEP-Weg (Kap. 3.5.1, Kap. 3.5.5), sie haben den cytosolischen MVA-Weg möglicherweise sekundär verloren. Aus Peridinin-haltigen Dinophyten konnten im Rahmen dieser Arbeit keine Sequenzen von Genen des MVA-Wegs etabliert werden (Kap. 3.5.4), und die Position der Ciliaten als daher einzige Vertreter der Apicomplexa wird in der Analyse der MVA-Gene aufgrund ihrer divergenten Sequenzen nicht aufgelöst (Kap. 3.7.2)

4.6 Identifizierung des MEP-Wegs in *Perkinsus* - Indiz für einen Plastiden im Austernparasiten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden aus den vorläufigen Rohdaten des TIGR-Genom-Sequenzierungsprojekts für *Perkinsus marinus* überraschenderweise sechs der sieben Gene des plastidären MEP-Wegs der IPP-Biosynthese identifiziert, wohingegen keine Sequenzen für Gene des cytosolischen MVA-Wegs etabliert werden konnten (Kap. 3.5.5 Grauvogel *et al.* 2006).

Der MEP-Pathway ist bisher ausschließlich in Plastiden nachgewiesen worden, er kommt auch in den heterotrophen Apicoplasten der Apicomplexa vor, in denen der cytosolische Weg nicht präsent ist (Gardner *et al.* 2002, diese Arbeit). Umgekehrt enthalten aplastidäre Eukaryoten ausschließlich den cytosolischen MVA-Weg, und es gibt keinerlei Hinweise darauf, dass selbiger jemals durch den MEP ersetzt worden wäre. Folglich ist die Existenz des plastidären MEP-Wegs in *Perkinsus* ein starkes Indiz für die Existenz eines bisher nicht entdeckten Plastiden. Dieser "Perkinsuplast" scheint analog zum Apicoplasten der Apicomplexa keine photosynthetische Funktion mehr zu besitzen, da das Genom (Rohdaten) keine Gene für an der Photosynthese beteiligte Enzyme enthält (www.tigr.org). Analog zu den im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Genen des plastidären MEP-Wegs wurden erst kürzlich unabhängige weitere Indizien für die Präsenz eines bisher unbekannten Plastiden in *Perkinsus marinus* veröffentlicht (Stelter *et al.* 2006).

Die phylogenetische Analyse der partiellen DXR aus *Perkinsus* (Kap. 3.8.1, Abb. 28) zeigt eine Assoziation zu der Sequenz aus dem Dinophyten *Pyrocystis lunula* und deutet auf einen möglichen gemeinsamen Ursprung der beiden Gruppen hin. Derartige Erkenntnisse könnten maßgeblich die taxonomische Klassifizierung der Perkinsea sowie das Verständnis von der frühen Evolution der Dinophyten und Apicomplexa sowie der Alveolaten im Allgemeinen beeinflussen. Viele Dinophyten sind heterotroph, und die phototrophen Spezies enthalten eine Vielzahl unterschiedlicher Plastiden, die durch unabhängige sekundäre und tertiäre Endosymbiosen entstanden sind und dementsprechend charakteristische akzessorische Photosynthese-Pigmente besitzen (Chesnick *et al.* 1997, Tengs *et al.* 2000, Saldarriaga *et al.* 2001, Hackett *et al.* 2003). Der überwiegende Teil der Dinophyten, zu dem auch *Pyrocystis lunula* gehört, enthält Peridinin; bisher wurde jedoch widersprüchlich diskutiert, ob es sich bei dieser Gruppe um die ursprüngliche Linie handelt, und ob der letzte gemeinsame Vorfahre aller Dinophyten überhaupt photosynthetisch war (Taylor 1980, Saldarriaga *et al.* 2001, Yoon *et al.* 2002, Inagaki *et al.* 2004).

In Übereinstimmung mit wirtszellspezifischen Markern (GPI, Kap. 3.3, Kap. 4.2; Reece *et al.* 1997, Saldarriaga *et al.* 2003, Leander und Keeling 2004) deutet die in dieser Arbeit analysierte plastidäre DXR auf eine enge Assoziation zwischen *Perkinsus* und *Pyrocystis* hin. Dementsprechend könnte der gemeinsame Vorfahre der Perkinsea und der Dinophyten bereits einen komplexen Plastiden besessen haben. Außerdem würde dies bedeuten, dass die ursprünglichen Dinophyten bereits Peridinin besaßen und die heterotrophen Linien den Plastiden sekundär verloren haben.

Trotz der vollständigen Sequenzierung des *Plasmodium*-Genoms (Gardner *et al.* 2002) konnte der Ursprung des Apicoplasten - eine sekundäre Endosymbiose mit einer Grün- oder einer Rotalge - nicht definitiv geklärt werden (Funes *et al.* 2002, Foth und McFadden 2003, Waller *et al.* 2003, Funes *et al.* 2003). Die widersprüchlichen Analysen beruhen möglicherweise auf den generell sehr divergenten Sequenzen aus *Plasmodium* und *Theileria*, die möglicherweise durch LBA-Effekte zu einer falschen Positionierung in den Stammbäumen führen (Brinkmann *et al.* 2005). Ein gemeinsamer Ursprung der Plastiden der Apicomplexa und Dinophyta wurde bereits postuliert (McFadden und Waller 1997), und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit könnte *Perkinsus* als Referenzgenom zum Test dieser Hypothese dienen, zumal die geschätzte Größe von Dinophyten-Genomen zwischen 3.000 und 215.000 MB liegt (Spector 1984) und daher vollständige Sequenzierungen sehr kostspielig sind.

Perkinsus ist das Verbindungsglied zwischen den Dinophyta und den Apicomplexa und stellt als solcher Schlüsselorganismus eine ideale Referenz zur Untersuchung von Biologie, Evolution und Infektionsstrategien der Alveolaten dar (Grauvogel *et al.* 2006). Darüber hinaus könnten Enzyme für plastidäre Stoffwechselwege wie zum Beispiel den MEP-Pathway möglicherweise als Ansatzpunkte für Medikamente zur Bekämpfung der durch "Dermo" verursachten Massensterben von Austern dienen.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Verbreitung der cytosolischen und der plastidären Isoform der Glucose-6-phosphat Isomerase (GPI) in den Vertretern der Plantae (Streptophyta/Chlorophyta, Rhodophyta und Glaucophyta), der Alveolata (Dinophyta, Apicomplexa, Perkinsea und Ciliata) und der "Chromista" (Haptophyta, Stramenopile und Cryptophyta) analysiert. Dazu wurden durch das Screenen von cDNA- und genomischen Genbanken sowie durch RT-PCR-Amplifikationen insgesamt zwölf unabhängige GPI-Sequenzen etabliert. Darüber hinaus konnte durch intensive Datenbankrecherchen ein umfassender Referenzdatensatz von GPI-Genen gewonnen werden.

Durch *in silico* Analysen konnte gezeigt werden, dass Chlorophyta, Rhodophyta und möglicherweise auch Glaucophyta ihr plastidäres Enzym durch unabhängige Rekrutierung der ursprünglich cytosolischen Isoform erworben haben. Chlorophyta haben nach der Duplikation die cytosolische Isoform verloren, was sich mit dem Fehlen einer cytosolischen Glykolyse deckt. In allen drei primären Algenabteilungen ging das cyanobakterielle Homolog verloren. Im Gegensatz dazu blieb es in den Landpflanzen (Streptophyta) als einziger Gruppe der Plantae erhalten und wurde offensichtlich sehr spät in der Evolution durch endosymbiotischen Gentransfer in den Kern der Wirtszelle übertragen. Aus der Grünalge *Mesostigma viride* konnte im Rahmen dieser Arbeit sowohl die cytosolische als auch - in Übereinstimmung mit der Klassifizierung dieses Organismus als primitivem Streptophyten - die plastidäre (cyanobakterielle) Isoform der GPI nachgewiesen werden.

Die umfangreichen phylogenetischen Analysen der GPI belegen einen polyphyletischen Ursprung der Sequenzen von „Chromista“, was auf eine unabhängige Evolution ihrer Wirtszellen hindeutet.

Der Schwerpunkt der hier vorliegenden Arbeit ist die Analyse der Verbreitung des cytosolischen Mevalonat (MVA)- und des plastidären Methylerythritol Phosphat (MEP)-Stoffwechselwegs der Isoprenoid-Biosynthese innerhalb der Eukaryoten. Sequenzinformationen für die fünf Gene des MVA- sowie die sieben Gene des MEP-Wegs wurden aus Vertretern der verschiedenen Abteilungen wiederum durch das Screenen von cDNA- und genomischen Genbanken, durch RT-PCR-Amplifikationen und durch Datenbankrecherchen gewonnen. Es konnten die Sequenzen für alle fünf Gene des cytosolischen MVA-Wegs und alle sieben Gene des plastidären MEP-Wegs aus dem Genomsequenzierungs-Projekt der Rotalge *Galdieria sulphuraria* etabliert werden. Aus dem Streptophyten *Mesostigma viride* und dem Glaucophyten *Cyanophora paradoxa*

wurde durch RT-PCR mit degenerierten Primern der Großteil der Gene für beide Stoffwechselwege amplifiziert. Die Identifizierung von drei cytosolischen MVA-Genen aus *Mesostigma* ist der erste Nachweis für die Existenz dieses Wegs in Grünalgen. Diese Ergebnisse untermauern die ehemals kontrovers diskutierte Klassifikation von *Mesostigma* als Streptophyt und deuten darauf hin, dass es sich bei dem cytosolischen MVA-Weg um ein charakteristisches Merkmal der Plantae handelt, welches in den Chlorophyta sekundär verloren ging.

Aus komplexen Algen wurden insgesamt 18 Sequenzen für die Isoprenoid-Biosynthese durch Screening von Genbanken oder durch RT-PCR etabliert. Aus dem Haptophyten *Emiliania huxleyi* wurden im Rahmen dieser Arbeit elf der zwölf Gene für die beiden Stoffwechselwege aus den Rohdaten des Genoms identifiziert, und von vier cytosolischen sowie sechs plastidären Genen konnte die Expression mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Die Sequenzen aller Gene aus beiden Wegen wurden durch Datenbank-Recherchen aus den Diatomeen *Thalassiosira pseudonana* sowie (bis auf ein Gen des cytosolischen Pathways) aus *Phaeodactylum tricornutum* etabliert. Darüber hinaus wurden Sequenzen für Gene des plastidären Wegs aus den Cryptophyten *Hanusia phi* und *Guillardia theta* sowie aus verschiedenen Vertretern der Peridinin-haltigen Dinophyten etabliert. Die phylogenetischen Analysen der Gene für den plastidären MEP-Weg unterstützen einen monophyletischen Ursprung der Plastiden der "Chromista". Im Gegensatz dazu legen die Phylogenien der Gene für den cytosolischen Weg - in Übereinstimmung mit den Ergebnissen für die GPI - einen polyphyletischen Ursprung der verschiedenen Abteilungen der "Chromista" nahe und bieten keine Unterstützung für die Chromalveolat-Hypothese. Die widersprüchlichen Phylogenien Plastiden- und Wirtszellenspezifischer Marker lassen sich durch die Annahme zusätzlicher tertiärer Endosymbiosen in Einklang bringen.

Die überraschende Identifikation von sechs der sieben Gene des plastidären MEP-Wegs in dem Austern-Parasiten *Perkinsus marinus* spricht für die Existenz eines bisher unbekannten Plastiden in diesem Alveolaten. Der MEP-Weg ist der einzige Pathway zur Isoprenoid-Biosynthese in *Plasmodium falciparum* und dient als Ansatzpunkt für die Therapie von Malaria. Analog dazu könnte die Inhibition des MEP-Wegs in den Perkinsea zur Bekämpfung des Massensterbens von Austern genutzt werden. Über diese ökonomische und ökologische Bedeutung hinaus zeichnet die Phylogenie der plastidären Gene des MEP-Wegs die Perkinsea als Schlüsselorganismen in der Evolution der Alveolaten aus. *Perkinsus* kann demnach als idealer Referenzorganismus für die weitere Erforschung von Biologie, Evolution und Infektionsstrategien der Alveolaten dienen.

6 Literatur

Allison LA, Simon LD, Maliga P (1996). Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *EMBO J* **15**(11):2802-9.

Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH, Zhou S, Allen AE, Apt KE, Bechner M, Brzezinski MA, Chaal BK, Chiovitti A, Davis AK, Demarest MS, Detter JC, Glavina T, Goodstein D, Hadi MZ, Hellsten U, Hildebrand M, Jenkins BD, Jurka J, Kapitonov VV, Kroger N, Lau WW, Lane TW, Larimer FW, Lippmeier JC, Lucas S, Medina M, Montsant A, Obornik M, Parker MS, Palenik B, Pazour GJ, Richardson PM, Ryneerson TA, Saito MA, Schwartz DC, Thamatrakoln K, Valentin K, Vardi A, Wilkerson FP, Rokhsar DS (2004). The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science* **306**(5693):79-86.

Apt KE, Zaslavkaia L, Lippmeier JC, Lang M, Kilian O, Wetherbee R, Grossman AR, Kroth PG (2002). In vivo characterization of diatom multipartite plastid targeting signals. *J Cell Sci* **115**(Pt 21):4061-4069.

Apt KE, Kroth-Pancic PG, Grossmann AR (1996). Stable transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mol Gen Genet* **252**(5):572-579.

Archibald JM, Rogers MB, Toop M, Ishida K, Keeling PJ (2003). Lateral gene transfer and the evolution of plastid-targeted proteins in the secondary plastid-containing alga *Bigeloviella natans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:7678-7683.

Bachvaroff TR, Sanchez-Puerta MV, Delwiche CF (2006). Rate variation as a function of gene origin in plastid-derived genes of peridinin-containing dinoflagellates. *J Mol Evol* **62**(1):42-52.

Barclay WR, Meager KM, Abril JR (1994). Heterotrophic production of long chain omega-3-fatty acids using algae and algae-like organisms. *J Appl Phycol* **6**:123-129.

Bhattacharya D (ed) (1997). *Origins of algae and their plastids*. Springer Verlag Wien.

Bhattacharya D, Medlin L (1995). The phylogeny of plastids: a review based on comparison of small-subunit ribosomal RNA coding regions. *J Phycol* **31**:489-498.

Bhaya D, Grossman AR (1991). Targeting proteins to diatom plastids involves transport through an endoplasmic reticulum. *Mol Gen Genet* **229**(3):400-404.

Bochar DA, Stauffacher CV, Rodwell VW (1999). Sequence comparisons reveal two classes of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Mol Genet Metab* **66**:122-127.

Bodyl A (2005). Do plastid-related characters support the Chromalveolate Hypothesis? *J Phycol* **41**(3):712.

Borrmann S, Adegnikaa AA, Moussavou F, Oyakhirome S, Esser G, Matsiegui PB, Ramharter M, Lundgren I, Kombila M, Issifou S, Hutchinson D, Wiesner J, Jomaa H, Kremsner PG (2005). Short-course regimens of artesunate-fosmidomycin in treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Antimicrob Agents Chemother* **49**(9):3749-3754.

Boucher Y, Kamekura M, Doolittle WF (2004). Origins and evolution of isoprenoid lipid biosynthesis in archaea. *Mol Microbiol* **52**(2):515-527.

Bouck GB (1965). Fine structure and organelle associations in brown algae. *J Cell Biol* **26**:523-537.

Brinkmann H, van der Giezen M, Zhou Y, Poncelin de Raucourt G, Philippe H (2005). An empirical assessment of long-branch attraction artefacts in deep eukaryotic phylogenomics. *Syst Biol* **54**:743-757.

Budin K, Philippe H (1998). New insights into the phylogeny of eukaryotes based on ciliate Hsp70 sequences. *Mol Biol Evol* **15**(8):943-956.

Cavalier-Smith T (2003). Genomic reduction and evolution of novel genetic membranes and protein-targeting machinery in eukaryote-eukaryote chimaeras (meta-algae). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**(1429):109-33; discussion 133-134.

Cavalier-Smith T (2000). Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci* **5**:174-182.

Cavalier-Smith T (1999). Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: euglenoid, Dinophyte, and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree. *J Euk Microbiol* **46**:347-366.

Cavalier-Smith T, Lee J (1985). Protozoa as hosts for endosymbioses and the conversion of symbionts into organelles. *J Protozool* **32**:376-37.

Cavalier-Smith, T. 1981. Eukaryotic kingdoms, seven or nine? *BioSystems* **14**:461-481.

Chesnick JM, Kooistra WH, Wellbrock U, Medlin L (1997). Ribosomal RNA analysis indicates a benthic pennate diatom ancestry for the endosymbionts of the dinoflagellates *Peridinium foliaceum* and *Peridinium balticum* (Pyrrhophyta). *J Euk Microbiol* **44**:314-320.

Connolly JD, Hill RA (1992). Dictionary of Terpenoids. Chapman & Hall, New York.

Cornish RM, Roth JR, Poulter CD (2006). Lethal mutations in the isoprenoid pathway of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* **188**(4):1444-50.

Cvejic JH, Rohmer M (2000). CO₂ as main carbon source for isoprenoid biosynthesis via the mevalonate-independent methylerythritol 4-phosphate route in the marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Nitzia ovalis*. *Phytochemistry* **53**:21-28.

Darwin C (1859). On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life. John Murray, London.

Delwiche CF (1999). Tracing the Thread of Plastid Diversity through the Tapestry of Life. *Am Nat* **154** (S4): S164-177.

Delwiche CF, Palmer JD (1997). The origin of plastids and their spread via secondary symbiosis. *Plant Syst Evol (Suppl)* **11**:53-86.

Disch A, Hemmerlin A, Bach TJ, Rohmer M (1998a). Mevalonate-derived isopentenyl diphosphate is the biosynthetic precursor of ubiquinone prenyl side chain in tobacco BY-2 cells. *Biochem J* **15**:615-621.

Disch A, Schwender J, Müller C, Lichtenthaler HK, Rohmer M (1998b). Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6714. *Biochem J* **333**:381-388.

Doolittle WF (1998). You are what you eat: a gene transfer ratchet could account for bacterial genes in eukaryotic nuclear genomes. *Trends Genet* **14**(8):307-311.

Doolittle WF (1996). Some aspects of the biology of cells and their possible evolutionary significance. *Symp Soc Gen Microbiol* **54**:1-21.

Douglas S, Zauner S, Fraunholz M, Beaton M, Penny S, Deng LT, Wu X, Reith M, Cavalier-Smith T, Maier UG (2001). The highly reduced genome of an enslaved algal nucleus. *Nature* **410**(6832):1091-1096.

Douglas SE (1998). Plastid evolution: origins, diversity, trends. *Curr Opin Genet Dev* **8** (6): 655-661.

Dufresne A, Salanoubat M, Partensky F, Artiguenave F, Axmann IM, Barbe V, Duprat S, Galperin MY, Koonin EV, Le Gall F, Makarova KS, Ostrowski M, Oztas S, Robert C, Rogozin IB, Scanlan DJ, Tandeau de Marsac N, Weissenbach J, Wincker P, Wolf YI, Hess WR (2003). Genome sequence of the cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* SS120, a nearly minimal oxyphototrophic genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(17):10020-10025.

Dzierszinski F, Popescu O, Tourse C, Slomianny C, Yahiaoui B, Tomavo S (1999). The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* expresses two functional plant-like glycolytic enzymes. Implications for evolutionary origin of apicomplexans. *J Biol Chem* **274**(35):24888-24895.

Eisen JA, Coyne RS, Wu M, Wu D, Thiagarajan M, Wortman JR, Badger JH, Ren Q, Amedeo P, Jones KM, Tallon LJ, Delcher AL, Salzberg SL, Silva JC, Haas BJ, Majoros WH, Farzad M, Carlton JM, Smith RK, Garg J, Pearlman RE, Karrer KM, Sun L, Manning G, Elde NC, Turkewitz AP, Asai DJ, Wilkes DE, Wang Y, Cai H, Collins K, Stewart BA, Lee SR, Wilamowska K, Weinberg Z, Ruzzo WL, Wloga D, Gaertig J, Frankel J, Tsao CC, Gorovsky MA, Keeling PJ, Waller RF, Patron NJ, Cherry JM, Stover NA, Krieger CJ, Del Toro C, Ryder HF, Williamson SC, Barbeau RA, Hamilton EP, Orias E (2006). Macronuclear Genome Sequence of the Ciliate *Tetrahymena thermophila*, a Model Eukaryote. PLoS Biol **4**(9).

Eisenreich W, Bacher A, Arigoni D, Rohdich F (2004). Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. Cell Mol Life Sci. **61**(12):1401-1426.

Eisenreich W, Rohdich F, Bacher A (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. Trends Plant Sci **6**:78-84.

Eisenreich W, Schwarz M, Cartayrade A, Arigoni D, Zenk MH, Bacher A (1998). The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. Chem Biol **5**:R211-R233.

Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. J Mol Biol **300**: 1005-1016.

Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G (1999). ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. Protein Sci **8**: 978-984.

Fagan T, Hastings W, Morse D (1998). Phylogeny of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase indicates lateral transfer from cryptomonads to Dinophytes. J Mol Evol **47**:633-639.

Fast NM, Kissinger JC, Roos DS, Keeling PJ (2001). Nuclear-encoded, plastid-targeted genes suggest a single common origin for apicomplexan and Dinophyte plastids. Mol Biol Evol **18**:418-426.

Felsenstein J (1978). Cases in which parsimony and compatibility methods will be positively misleading. *System Zool* **27**:401-410.

Feng DF, Cho G, Doolittle RF (1997). Determining divergence times with a protein clock: update and reevaluation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:13028-13033.

Foth BJ, McFadden GI (2003). The apicoplast: a plastid in *Plasmodium falciparum* and other Apicomplexan parasites. *Int Rev Cytol* **224**:57-110.

Foth BJ, Ralph SA, Tonkin CJ, Struck NS, Fraunholz M, Roos DS, Cowman AF, McFadden GI (2003). Dissecting apicoplast targeting in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* **299**: 705-708.

Funes S, Davidson E, Reyes-Prieto A, Magallon S, Herion P, King MP, Gonzalez-Halphen D (2003). Response to comment on "A green algal apicoplast ancestor". *Science* **301**:49b.

Funes S, Davidson E, Reyes-Prieto A, Magallon S, Herion P, King MP, Gonzalez-Halphen D (2002). A green algal apicoplast ancestor. *Science* **298**:2155.

Gajadhar AA, Marquardt WC, Hall R, Gunderson J, Ariztia-Carmona EV, Sogin ML (1991). Ribosomal RNA sequences of *Sarcocystis muris*, *Theileria annulata* and *Cryptosporidium parvum* reveal evolutionary relationships among apicomplexans, Dinophytes, and ciliates. *Mol Biochem Parasitol* **45**(1):147-154.

Gardner MJ, Bishop R, Shah T, de Villiers EP, Carlton JM, Hall N, Ren Q, Paulsen IT, Pain A, Berriman M, Wilson RJ, Sato S, Ralph SA, Mann DJ, Xiong Z, Shallom SJ, Weidman J, Jiang L, Lynn J, Weaver B, Shoaibi A, Domingo AR, Wasawo D, Crabtree J, Wortman JR, Haas B, Angiuoli SV, Creasy TH, Lu C, Suh B, Silva JC, Utterback TR, Feldblyum TV, Perteza M, Allen J, Niernan WC, Taracha EL, Salzberg SL, White OR, Fitzhugh HA, Morzaria S, Venter JC, Fraser CM, Nene V (2005). Genome sequence of *Theileria parva*, a bovine pathogen that transforms lymphocytes. *Science* **309**(5731):134-137.

Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S, Paulsen IT, James K, Eisen JA, Rutherford K, Salzberg SL, Craig A, Kyes S, Chan MS, Nene V, Shallom SJ, Suh B, Peterson J, Angiuoli S, Pertea M, Allen J, Selengut J, Haft D, Mather MW, Vaidya AB, Martin DM, Fairlamb AH, Fraunholz MJ, Roos DS, Ralph SA, McFadden GI, Cummings LM, Subramanian GM, Mungall C, Venter JC, Carucci DJ, Hoffman SL, Newbold C, Davis RW, Fraser CM, Barrell B (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Nature **419**(6906):498-511.

Gibbs SP (1981). The chloroplast endoplasmic reticulum: structure, function, and evolutionary significance. Int Rev Cytol **72**:49-99.

Gladue RM, Maxey JE (1994). Microalgal feeds for aquaculture. J Appl Phycol **6**:131-141.

Gould SB, Sommer MS, Hadfi K, Zauner S, Kroth PG, Maier UG (2006). Protein Targeting into the Complex Plastid of Cryptophytes. J Mol Evol **62**:674-681.

Grauvogel C, Brinkmann H, Petersen J (2007). Evolution of the Glucose-6-phosphate Isomerase: The Amazing Plasticity of Primary Metabolism in Plantae, Alveolates and "Chromists". Nicht veröffentlicht.

Grauvogel C, Petersen J (2007). Isoprenoid Biosynthesis Authenticates the Classification of the Green Alga *Mesostigma viride* as the most ancient Streptophyte. Nicht veröffentlicht.

Grauvogel C, Reece KS, Brinkmann H, Petersen J (2006). Plastid isoprenoid metabolism in the oyster parasite *Perkinsus marinus* connects dinoflagellates and malaria pathogens - new impetus for studying alveolates. J Mol Evol, eingereicht.

Grauvogel C (2003). Molekulare und phylogenetische Charakterisierung zweier glykolytischer Gene (Pyruvat Kinase und Glucose-6-Phosphat Isomerase) von Glaucocystophyten, primären und sekundären Rotalgen. Diplomarbeit, TU Braunschweig.

Grochowski LL, Xu H, White RH (2006). *Methanocaldococcus jannaschii* Uses a Modified Mevalonate Pathway for Biosynthesis of Isopentenyl Diphosphate. J Bacteriol **188**(9):3192-3198.

Gutensohn M, Fan E, Frielingsdorf S, Hanner P, Hou B, Hust B, Klosgen RB (2006). Toc, Tic, Tat *et al.*: structure and function of protein transport machineries in chloroplasts. J Plant Physiol **163**(3):333-347.

Hackett JD, Maranda L, Yoon HS, Bhattacharya D (2003). Phylogenetic evidence for the cryptophyte origin of the plastid of *Dinophysis* (Dinophysiales, Dinophyceae). J Phycol **39**:440-448.

Harper JT, Waanders E, Keeling PJ (2005). On the monophyly of chromalveolates using a six-protein phylogeny of eukaryotes. Int J Syst Evol Microbiol **55**(Pt 1):487-496.

Harper JT, Keeling PJ (2003). Nucleus-encoded, plastid-targeted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) indicates a single origin for chromalveolate plastids. Mol Biol Evol **20**:1730-1735.

Hedges SB, Blair JE, Venturi ML, Shoe JL (2004). A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. BMC Evol Biol **28**;4:2.

Henze K, Horner DS, Suguri S, Moore DV, Sanchez LB, Muller M, Embley TM (2001). Unique phylogenetic relationships of glucokinase and glucosephosphate isomerase of the amitochondriate eukaryotes *Giardia intestinalis*, *Spironucleus barkhanus* and *Trichomonas vaginalis*. Gene **281**(1-2):123-131.

Horner DS, Hirt RP, Kilvington S, Lloyd D, Embley TM (1996). Molecular data suggest an early acquisition of the mitochondrion endosymbiont. Proc Biol Sci **263**(1373):1053-1059.

Inagaki Y, Simpson A, Dacks J, Roger A (2004). Phylogenetic artifacts can be caused by leucine, serine, and arginine codon usage heterogeneity: dinoflagellate plastid origins as a case study. Syst Biol **53**(4):582-593.

Ishida K, Cavalier-Smith T, Green BR (2000). Endomembrane structure and the chloroplast protein targeting pathway in *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae, Chromista). J Phycol **36**:1135-1144.

Istvan ES, Deisenhofer J (2001). Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. Science **292**(5519):1160-1164.

Jarvis P, Soll J (2002). Toc, tic, and chloroplast protein import. *Biochim Biophys Acta* **1590**(1-3):177-189.

Jomaa H, Wiesner J, Sanderbrand S, Altincicek B, Weidemeyer C, Hintz M, Turbachova I, Eberl M, Zeidler J, Lichtenthaler HK, Soldati D, Beck E (1999). Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* **285**(5433):1573-1576.

Katsuki H, Bloch K (1967). Studies on the Biosynthesis of ergosterol in yeast: Formation of methylated intermediates. *J Biol Chem* **242**:222-227.

Katz LA (1996). Transkingdom transfer of the phosphoglucose isomerase gene. *J Mol Evol* **43**(5):453-459.

Keeling PJ, Archibald JM, Fast NM, Palmer JD (2004). Comment on "The evolution of modern eukaryotic phytoplankton". *Science* **306**(5705):2191.

Kilian O, Kroth PG (2005). Identification and characterization of a new conserved motif within the presequence of proteins targeted into complex diatom plastids. *Plant J* **41**:175-183.

Kilian O, Kroth PG (2004). Presequence Acquisition During Secondary Endocytobiosis and the Possible Role of Introns. *J Mol Evol* **58**: 712-721.

Kilian O, Kroth PG (2003). Evolution of Protein Targeting into "Complex" Plastids: The "Secretory Transport Hypothesis". *Plant Biol* **5**:350-358.

Kojo H, Shigi Y, Nishida M (1980). FR 31564, a new phosphonic acid antibiotic: bacterial resistance and membrane permeability. *J Antibiot* **33**(1):44-48.

Kroth PG, Schroers Y, Kilian O (2005). The peculiar distribution of class I and class II aldolases in diatoms and in red algae. *Curr Genet* **48**(6):389-400,

Kroth PG (2002). Protein transport into secondary plastids and the evolution of primary and secondary plastids. *Int Rev Cytol* **221**:191-255.

Kroth PG, Strothmann H (1999). Diatom plastids: secondary endocytobiosis, plastid genome and protein import. *Phys Plant* **107**:136-141.

Kuzuyama T (2002). Mevalonate and Nonmevalonate Pathways for the Biosynthesis of Isoprene Units. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**(8):1619-1627.

Lange BM, Ghassemian M (2003). Genome organisation in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant Mol Biol* **51**:925-948.

Lange BM, Rujan T, Martin W, Croteau R (2000). Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**(24):13172-13177.

Leander BS, Keeling PJ (2004). Early evolutionary history of Dinophytes and apicomplexans (alveolata) as inferred from hsp90 and actin phylogenies. *J Phycol* **40**:341-350.

Leister D (2003). Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genet* **19**:46-47.

Levine ND (1978). *Perkinsus* gen. n. and other new taxa in the protozoan phylum Apicomplexa. *J Parasitol* **64**:549.

Liaud MF, Lichtlé C, Apt K, Martin W, Cerff R (2000). Compartment-specific isoforms of TPI and GAPDH are imported into diatom mitochondria as a fusion protein: evidence in favor of a mitochondrial origin of the eukaryotic glycolytic pathway. *Mol Biol Evol* **17**(2):213-223.

Liaud MF, Brandt U, Scherzinger M, Cerff R (1997). Evolutionary Origin of Cryptomonad Microalgae: Two Novel Chloroplast/Cytosol-Specific GAPDH Genes as Potential Markers of Ancestral Endosymbiont and Host Cell Components. *J Mol Evol* **44**(Suppl1): S28-S37.

Lichtenthaler HK, Rohmer M, Schwender J (1997a). Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate biosynthesis in higher plants. *Physiol Plant* **101**:643-652.

Lichtenthaler HK, Schwender J, Disch A, Rohmer M (1997b): Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett* **400**: 271-274.

Loreto F, Pinelli P, Brancaleoni E, Ciccioli P (2004). ^{13}C labeling reveals chloroplastic and extrachloroplastic pools of dimethylallyl pyrophosphate and their contribution to isoprene formation. *Plant Phys* **135**:1903-1907.

Lynen F (1967). Biosynthetic pathways from acetate to natural products. *Pure Appl Chem* **14**:137-167.

Maheswari U, Montsant A, Goll J, Krishnasamy S, Rajyashri KR, Patell VM, Bowler C (2005). The Diatom EST Database. *Nucleic Acids Res* **33**(Database issue):D344-347.

Margulis L (1970). *Origin of Eukaryotic Cells*. Yale University Press, ISBN 0300013531.

Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa M, Penny D (2002). Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**(19):12246-12251.

Martin W, Herrmann RG (1998). Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? *Plant Physiol* **118**: 9-17.

Martin W, Müller M (1998). The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* **392** (6671): 37-41.

Martin W, Stoebe B, Goremykin V, Hansmann S, Hasegawa M, Kowallik K (1998). Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* **393**: 162-165.

Martin W, Schnarrenberger C (1997). The evolution of the Calvin cycle from prokaryotic to eukaryotic chromosomes: a case study of functional redundancy in ancient pathways through endosymbiosis. *Curr Genet* **32**: 1-18.

Massé G, Belt ST, Rowland SJ (2004a). Biosynthesis of unusual monocyclic alkenes by the diatom *Rhizosolenia setigera* (Brightwell). *Phytochemistry* **65**:1101-1106.

Massé G, Belt ST, Rowland SJ, Rohmer M (2004b). Isoprenoid biosynthesis in the diatoms *Rhizosolenia setigera* (Brightwell) and *Haslea ostrearia* (Simonsen). *Proc Natl Acad Sci USA* **101**(13):4413-4418.

Matsuzaki M, Misumi O, Shin-I T, Maruyama S, Takahara M, Miyagishima SY, Mori T, Nishida K, Yagisawa F, Nishida K, Yoshida Y, Nishimura Y, Nakao S, Kobayashi T, Momoyama Y, Higashiyama T, Minoda A, Sano M, Nomoto H, Oishi K, Hayashi H, Ohta F, Nishizaka S, Haga S, Miura S, Morishita T, Kabeya Y, Terasawa K, Suzuki Y, Ishii Y, Asakawa S, Takano H, Ohta N, Kuroiwa H, Tanaka K, Shimizu N, Sugano S, Sato N, Nozaki H, Ogasawara N, Kohara Y, Kuroiwa T (2004). Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* **428**(6983):653-657.

Mattox KR, Stewart KD (1984). Classification of the green algae: a concept based on comparative cytology. Pp. 29-72 in D. E. G. Irvine and D. M. John, eds. *The Systematics of green algae*. Academic Press, London, UK.

McCourt RM, Delwiche CF, Karol KG (2004). Charophyte algae and land plant origins. *Trends Ecol Evol* **19**(12):661-666.

McFadden GI (2001). Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. *J. Phycol* **37**:951-959.

McFadden GI, Waller RF (1997). Plastids in parasites of humans. *Bioessays* **19**(11):1033-40.

McFadden GI, Reith ME, Munholland J, Lang-Unnasch N (1996). Plastid in human prarasites. *Nature* **381**:482.

Mereschkowsky C (1910). Theorie der zwei Plasmaarten als Grundlage der Symbiogenese, einer neuen Lehre von der Entstehung der Organismen. *Biol Zentralbl* **30**:278-367.

Mereschkowsky C (1905). Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol Zentralbl* **25**:593-604.

Michels AK, Wedel N, Kroth PG (2005). Diatom plastids possess a phosphoribulokinase with an altered regulation and no oxidative pentose phosphate pathway. *Plant Physiol* **137**(3):911-920.

Mine Y, Kamimura T, Nonoyama S, Nishida M, Goto S, Kuwahara S (1980). In vitro and in vivo antibacterial activity of FR 31564, a new phosphonic acid antibiotic. *J Antibiot* **33**(1): 36-43.

Misumi O, Matsuzaki M, Nozaki H, Miyagishima SY, Mori T, Nishida K, Yagisawa F, Yoshida Y, Kuroiwa H, Kuroiwa T (2005). *Cyanidioschyzon merolae* genome. A tool for facilitating comparable studies on organelle biogenesis in photosynthetic eukaryotes. *Plant Physiol* **137**(2):567-85.

Nedelcu AM, Borza T, Lee RW (2006). A Land Plant-Specific Multigene Family in the Unicellular *Mesostigma* Argues for Its Close Relationship to Streptophyta. *Mol Biol Evol* **23**(5):1011-1015.

Nes WD, Venkatramesh M (1999). Enzymology of phytosterol transformations. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **34**:81-93.

Neuhaus HE, Wagner R (2000). Solute pores, ion channels, and metabolite transporters in the outer and inner envelope membranes of higher plant plastids. *Biochim Biophys Acta* **1465**:307-349.

Nowitzki U, Flechner A, Kellermann J, Hasegawa M, Schnarrenberger C, Martin W (1998). Eubacterial origin of nuclear genes for chloroplast and cytosolic glucose-6-phosphate isomerase from spinach: sampling eubacterial gene diversity in eukaryotic chromosomes through symbiosis. *Gene* **214**(1-2):205-213.

Nozaki H, Matsuzaki M, Takahara M, Misumi O, Kuroiwa H, Hasegawa M, Shin-I T, Kohara Y, Ogasawara N, Kuroiwa T (2003). The phylogenetic position of red algae revealed by multiple nuclear genes from mitochondria-containing eukaryotes and an alternative hypothesis on the origin of plastids. *J Mol Evol* **56**(4):485-497.

Ospina-Giraldo MD, Jones RW (2003). Characterization of the glucose-6-phosphate isomerase gene in *Phytophthora infestans* reveals the presence of multiple alleles. *Fungal Genet Biol* **40**(3):197-206.

Pain A, Renauld H, Berriman M, Murphy L, Yeats CA, Weir W, Kerhornou A, Aslett M, Bishop R, Bouchier C, Cochet M, Coulson RM, Cronin A, de Villiers EP, Fraser A, Fosker N, Gardner M, Goble A, Griffiths-Jones S, Harris DE, Katzer F, Larke N, Lord A, Maser P, McKellar S, Mooney P, Morton F, Nene V, O'Neil S, Price C, Quail MA, Rabbinowitsch E, Rawlings ND, Rutter S, Saunders D, Seeger K, Shah T, Squares R, Squares S, Tivey A, Walker AR, Woodward J, Dobbelaere DA, Langsley G, Rajandream MA, McKeever D, Shiels B, Tait A, Barrell B, Hall N (2005). Genome of the host-cell transforming parasite *Theileria annulata* compared with *T. parva*. *Science* **309**(5731):131-133.

Palmer JD (2003). The symbiotic birth and spread of plastids: how many times and whodunit? *J Phycol* **39**:4-11.

Patron NJ, Waller RF, Archibald JM, Keeling PJ (2005). Complex protein targeting to Dinophyte plastids. *J Mol Biol* **348**:1015-1024.

Patron NJ, Rogers MB, Keeling PJ (2004). Gene replacement of fructose-1,6-bisphosphate aldolase supports the hypothesis of a single photosynthetic ancestor of chromalveolates. *Eukaryot Cell* **3**(5):1169-1175.

Perkins FO (1996). The structure of *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen and Collier, 1950) Levine, 1978 with comments on taxonomy and phylogeny of *Perkinsus* ssp. *J Shellfish Res* **15**:67-87.

Petersen J, Teich R, Brinkmann H, Cerff R (2006a). A "green" phosphoribulokinase in complex algae with red plastids: evidence for a single secondary endosymbiosis leading to haptophytes, cryptophytes, heterokonts, and Dinophytes. *J Mol Evol* **62**(2):143-157.

Petersen J, Teich R, Becker B, Cerff R, Brinkmann H (2006b). The GapA/B Gene Duplication Marks the Origin of Streptophyta (Charophytes and Land Plants). *Mol Biol Evol* **23**(6):1109-1118.

Philippe H (1993). MUST, a computer package of management utilities for sequences and trees. *Nucleic Acids Res* **21**(22):5264-5272.

Plaxton WC (1996). The Organization and Regulation of Plant Glycolysis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**:185-214.

Popják G (1958). Biosynthesis of cholesterol and related substances. *Annu Rev Biochem* **27**(3):533-60.

Preisig HR, Anderson OR, Corliss JO, Moestrup O, Powell MJ, Roberson RW, Wetherbee R (1994). Terminology and nomenclature of protist cell surface structures. *Protoplasma* **181**:1-28.

Reece KS, Siddall ME, Bureson EM, Graves JE (1997). Phylogenetic analysis of *Perkinsus* based on actin gene sequences. *J Parasitol* **83**:417-423.

Reumann S, Keegstra K (1999). The endosymbiotic origin of the protein import machinery of chloroplastic envelope membranes. *Trends Plant Sci* **4**(8): 302-307.

Río Bártulos Carolina, TU Braunschweig, Spielmannstraße 7, 38106 Braunschweig, Germany.

Rodríguez-Concepción M, Boronat A (2002). Elucidation of the Methylerythritol Phosphate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria and Plastids. A Metabolic Milestone Achieved through Genomics. *Plant Phys* **130**:1079-1089.

Rodríguez-Ezpeleta N, Philippe H, Brinkmann H, Becker B, Melkonian M (2006). Phylogenetic Analyses of Nuclear, Mitochondrial and Plastid Multi-Gene Datasets Support the Placement of *Mesostigma* in the Streptophyta. *Mol Biol Evol* 2006 Dec 16; [Epub ahead of print].

Rodríguez-Ezpeleta N, Brinkmann H, Burey SC, Roure B, Burger G, Löffelhardt W, Bohnert HJ, Philippe HJ, Lang BF (2005). Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, and glaucophytes. *Curr Biol* **15**(14):1325-1330.

Rohmer M, Seemann M, Horbach S, Bringer-Meyer S, Sahm H (1996). Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *J Am Chem Soc* **118**:2564-2566.

Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahm H (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: A novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J* **295**:517-524.

Round FE, Crawford RM, Mann DG (1990). The Diatoms: biology and morphology of the genera. Cambridge Univ Press, Cambridge, UK.

Rudolph B, Hansen T, Schonheit P (2004). Glucose-6-phosphate isomerase from the hyperthermophilic archaeon *Methanococcus jannaschii*: characterization of the first archaeal member of the phosphoglucose isomerase superfamily. Arch Microbiol **181**(1):82-7.

Saldarriaga JF, McEwan ML, Fast NM, Taylor FJ, Keeling PJ (2003). Multiple protein phylogenies show that *Oxyrrhis marina* and *Perkinsus marinus* are early branches of the Dinophyte lineage. Int J Syst Evol Microbiol **53**:355-365.

Saldarriaga JF, Taylor FJ, Keeling PJ, Cavalier-Smith T (2001). Dinoflagellate nuclear SSU rRNA phylogeny suggests multiple plastid losses and replacements. J Mol Evol **53**(3):204-13.

Sánchez Puerta MV, Bachvaroff TR, Delwiche CF (2005). The Complete Plastid Genome Sequence of the Haptophyte *Emiliania huxleyi*: a Comparison to Other Plastid Genomes. DNA Res **12**:151-156.

Sánchez Puerta MV, Bachvaroff TR, Delwiche CF (2004). The Complete Mitochondrial Genome Sequence of the Haptophyte *Emiliania huxleyi* and its Relation to Heterokonts. DNA Res **11**:1-10.

Scala S, Carels N, Falciatore A, Chiusano ML, Bowler C (2002). Genome properties of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. Plant Phys **129**:993-1002.

Schimper AFW (1883). Ueber die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. Botanische Zeitung **41**(7): 105-114, 121-131, 137-146, 153-162.

Schnarrenberger C, Pelzer-Reith B, Yatsuki H, Freund S, Jacobshagen S, Hori K (1994). Expression and sequence of the only detectable aldolase in *Chlamydomonas reinhardtii*. Arch Biochem Biophys **313**(1):173-178.

Schnarrenberger C, Jacobshagen S, Müller B, Krüger I (1990). Evolution of isozymes of sugar phosphate metabolism in green algae. Prog Clin Biol Res **344**:743-764.

Schwartzbach SD, Osafune T, Löffelhardt W (1998). Protein import into cyanelles and complex chloroplasts. *Plant Mol Biol* **38**:247-263.

Schwender J, Gemünden C, Lichtenthaler HK (2001). Chlorophyta exclusively use the 1-deoxyxylulos 5-phosphate/2-C-methylerythritol 4-phosphate pathway for the biosynthesis of isoprenoids. *Planta* **212**:416-423.

Shrager J, Hauser C, Chang CW, Harris EH, Davies J, McDermott J, Tamse R, Zhang Z, Grossman AR (2003). *Chlamydomonas reinhardtii* genome project. A guide to the generation and use of the cDNA information. *Plant Physiol* **131**(2):401-408.

Simon A, Glöckner G, Felder M, Melkonian M, Becker B (2006). EST analysis of the scaly green flagellate *Mesostigma viride* (Streptophyta): Implications for the evolution of green plants (Viridiplantae). *BMC Plant Biol.* **6**:2.

Sogin ML, Silberman JD (1998). Evolution of the protists and protistan parasites from the perspective of molecular systematics. *Int J Parasitol* **28**(1):11-20.

Spurgeon SL, Porter JW (1981). Introduction. In: Porter JW, Spurgeon SL (eds). *Biosynthesis of isoprenoid compounds*. Vol 1, Wiley, New York: 1-46.

Stegemann S, Hartmann S, Ruf S, Bock R (2003). High-frequency gene transfer from the chloroplast genome to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(15):8828-8833.

Stelter K, El-Sayed NM, Seeber F (2006). The Expression of a Plant-type Ferredoxin Redox System provides Molecular Evidence for a Plastid in the Early Dinoflagellate *Perkinsus marinus*. *Protist* 2006 Nov 21; [Epub ahead of print].

Sulli C, Fang Z, Muchhal U, Schwartzbach SD (1999). Topology of *Euglena* chloroplast protein precursors within endoplasmic reticulum to Golgi to chloroplast transport vesicles. *J Biol Chem* **274**(1):457-463.

Taylor FJ (1980). On dinoflagellate evolution. *Biosystems* **13**(1-2):65-108.

Teich R, Grauvogel C, Petersen J (2007). The Intron Distribution in Plantae: Stasis among 500 my of Land Plant Evolution. Nicht veröffentlicht.

Teich R, Zauner S, Brinkmann H, Petersen J (2006). Origin and Distribution of Calvin Cycle Fructose and Sedoheptulose Bisphosphatase in Plantae and Complex Algae. A Single Secondary Origin of Complex Red Plastids and Subsequent Propagation via Tertiary Endosymbioses. *Protist*, im Druck.

Teich R (2002). Klonierung und Charakterisierung der Gene für cytosolische Glucose-6-phosphat Isomerase und cytosolisch/plastidäre Isoformen der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase aus Haptophyten (*Pavlova lutheri* und *Prymnesium parvum*). Diplomarbeit, TU Braunschweig.

Tengs T, Dahlberg O, Shalchian-Tabrizi K, Klaveness D, Rudi K, Delwiche CF, Jakobsen K (2000). Phylogenetic analyses indicate that the 19'Hexanoyloxy-fucoxanthin-containing dinoflagellates have tertiary plastids of haptophyte origin. *Mol Biol Evol* **17**:718-729.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jaenmougin F, Higgins DG (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**:4876-4882.

Tyler BM, Tripathy S, Zhang X, Dehal P, Jiang RH, Aerts A, Arredondo FD, Baxter L, Bensasson D, Beynon JL, Chapman J, Damasceno CM, Dorrance AE, Dou D, Dickerman AW, Dubchak IL, Garbelotto M, Gijzen M, Gordon SG, Govers F, Grunwald NJ, Huang W, Ivors KL, Jones RW, Kamoun S, Krampis K, Lamour KH, Lee MK, McDonald WH, Medina M, Meijer HJ, Nordberg EK, Maclean DJ, Ospina-Giraldo MD, Morris PF, Phuntumart V, Putnam NH, Rash S, Rose JK, Sakihama Y, Salamov AA, Savidor A, Scheuring CF, Smith BM, Sobral BW, Terry A, Torto-Alalibo TA, Win J, Xu Z, Zhang H, Grigoriev IV, Rokhsar DS, Boore JL (2006). *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* **313**(5791):1261-1266.

van de Peer Y, R De Wachter (1997). Evolutionary relationships among the eukaryotic crown taxa taking into account site-to-site rate variation in 18S rRNA. *J Mol Evol* **45**: 619-630.

van de Peer Y, SA Rensing, UG Maier, R De Wachter (1996). Substitution rate calibration of small subunit ribosomal RNA identifies chlorarachniophyte endosymbionts as remnants of green algae. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**(15): 7732-7736.

van den Hoek C, Jahns HM, Mann DG (1993). Algen. 3., neubearbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart, ISBN 3-13-551103-0.

Verhees CH, Huynen MA, Ward DE, Schiltz E, de Vos WM, van der Oost J (2001). The phosphoglucose isomerase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* is a unique glycolytic enzyme that belongs to the cupin superfamily. J Biol Chem **276**:40926-40932.

Viola R, Nyvall P, Pedersen M (2001). The unique features of starch metabolism in red algae. Proc Biol Sci **268**(1474):1417-1422.

Vothknecht UC, Soll J (2005). Chloroplast membrane transport: interplay of prokaryotic and eukaryotic traits. Gene **354**: 99-109.

Wahlund TM, Hadaegh AR, Clark R, Nguyen B, Fanelli M, Read BA (2004). Analysis of Expressed Sequence Tags from Calcifying Cells of Marine Coccolithophorid (*Emiliania huxleyi*). Mar Biotechnol **6**:278-290.

Waller RF, Keeling PJ, van Dooren GG, McFadden GI (2003). Comment on "A green algal apicoplast ancestor". Science **301**:49a.

Waller RF, Keeling PJ, Donald RG, Striepen B, Handman E, Lang-Unnasch N, Cowman AF, Besra GS, Roos DS, McFadden GI (1998). Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci USA **95**:12352-12357.

Wastl J, Maier UG (2000). Transport of proteins into cryptomonads complex plastids. J Biol Chem **275**:23194-23198.

Werner D (1997). The biology of diatoms. University of California Press, Berkeley.

Westbroek P, Brown CW, van Bleijswijk J, Brummer GJ, Conte MH, Egge J, Fernandez E, Jordan R, Knappertsbusch M, Veldhuis M, van der Wal P, Young J (1993). A model system approach to biological climate forcing: The example of *Emiliania huxleyi*. Global Planet Change **8**:27-46.

Wiesner J, Borrmann S, Jomaa H (2003). Fosmidomycin for the treatment of malaria. *Parasitol Res* **90**:S71-S76.

Wilding EI, Brown JR, Bryant AP, Chalker AF, Holmes DJ, Ingraham KA, Iordanescu S, So CY, Rosenberg M, Gwynn MN (2000). Identification, evolution, and essentiality of the mevalonate pathway for isopentenyl diphosphate biosynthesis in Gram-positive cocci. *J Bacteriol* **182**:5147-5152.

Wilson RJ, Denny W, Preiser PR, Rangachari K, Roberts K, Roy A, Whyte A, Strath M, Moore DJ, Moore PW, Williamson DH (1996). Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol* **261**:155-172.

Yoon HS, JD Hackett, C Ciniglia, G Pinto, D Bhattacharya (2004). A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol Biol Evol* **21**, 809-818.

Yoon HS, Hackett JD, Pinto G, Bhattacharya D (2002). The single, ancient origin of chromist plastids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(24):15507-15512.

Yu TS, Lue WL, Wang SM, Chen J (2000). Mutation of *Arabidopsis* plastid phosphoglucose isomerase affects leaf starch synthesis and floral initiation. *Plant Physiol* **123**:319-325.

Zaslavskaja LA, Lippmeier JC, Kroth PG, Grossman AR, Apt KE (2000). Transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) with a variety of selectable marker and reporter genes. *J Phycol* **36**:379-386.

Zeidler JG, Lichtenthaler HK, May HU, Lichtenthaler FW (1997). Is isoprene emitted by plants synthesized via the novel isopentenyl pyrophosphate pathway? *Z Naturforsch* **52c**:15-30.

7 Anhang

7.1 In dieser Arbeit verwendete degenerierte PCR-Primer

Zur Amplifikation von Genfragmenten unbekannter Gene für die Glucose-6-phosphat Isomerase (GPI) und für die Enzyme der IPP-Biosynthesewege wurden die in Tabelle 9 aufgeführten degenerierten Primer eingesetzt. Die Benennung der Primer entspricht den Laborbezeichnungen und beruht auf der laufenden Nummerierung aller in der Arbeitsgruppe verwendeten Primer.

Tab. 9: In dieser Arbeit verwendete degenerierte Primer

Pathway	Gen	Primer-Name	Sequenz (5' -> 3')
Glykolyse	GPI _{cyt}	P021(+)	GCSTTCTGGGAYTGGGTNGGNGG
		P022(-)	AGCTCSACNCCCCAYTGRTCAAA
		P906(+)	GTSACSGAGGCSTGGAARGA
	GPI _{pla}	P096(+)	ACSGTSTACGSAAYAARGG
		P097(-)	TCSACSCCSGGCTGGTGGTANGC
MVA (cyt)	HMGS (cyt-1)	P395(+)	GGSAAGTACACSATCGGSCTSGGNCA
		P396(+)	AACGCSTGCTACGSGGNAC
		P397(-)	TYSGGCTTGTTAGAARTCRTA
		P802(+)	ATYCTSGCBATGGAYATYTACTTCCC
		P893(-)	GCSGTGTACATGTTSCCSAC
		P935(-)	ACGAASTCCTTSGCSCCRTA
	HMGR (cyt-2)	P398(+)	GTSCCSATGGCSACSACSGARGG
		P399(-)	ACCATGTTTCATSCCATSGCRTC
	MK (cyt-3)	P400(+)	ATSCACGSAASCCSWSSGG
		P401(-)	CASCCSCCSCCSCGSCCSCGT
		P894(+)	GGSGAGCACGCSGTSGTSCAYGG
		P895(+)	GTSGGSCGSAACACSAAGGCSYT
		P897(-)	CCSCCSCCSCGSCCSCGTSARYTT

7 Anhang

	PMK (cyt-4)	P402(+)	GGSAAGGTSGGSWSSGGSTTCGACGT
		P403(-)	GCGTCGAASCCSCCSGCSCCSGGNAC
		P898(+)	GCSTCSGCSCCSGGSAAGGTNYT
		P899(-)	GCSGGSGGSTACCTSGTSCTNGA
		P900(+)	GCGTCGAASCCSCCSGCSCCNNG
		P901(-)	GCSGCSGASGASCCSAGSCCSGTYYT
	MDD (cyt-5)	P404(+)	AACATCGCSGTSATCAAGTAYTGGGG
		P405(-)	CCSGCSCSGTSGGGAAGTTRTT
MEP (pla)	DXS (pla-1)	P927(+)	TACTACGTSGGSCCSGTSGAYGGNCA
		P928(-)	ACGTCGTGSAYSAYYTGRTCRTA
	DXR (pla-2)	P305(+)	GTSGTSACSGGSATCGTSGGSTGCGC
		P307(+)	GAGCACWSSGCSATCTTCCAGTG
		P308(-)	GCCTCGATSACCTCSAGSCCCTTGTT
	MCT (pla-3)	P409(+)	CCSGGSAAGGAGCGSC
		P410(-)	ATSSWSACGTCTGTCGTSACYTC
	CMK (pla-4)	P411(+)	CTSTTCWSSCCSTGCAAGATHAA
		P412(-)	AASGCSGGSKGCTCSAGGTCRTT
	MECPS (pla-5)	P413(+)	GCSCACWSSGACGGSGAYGT
		P414(-)	ACCTTCTCGTSGTCYKSGCYTT
	HDS (pla-6)	P488(+)	ATCMGSGTSAACCCSGGSAAYTT
		P489(-)	GCCTTCATSSWGAASACGAAGTTRTG
	HDR (pla-7)	P919(+)	TACGGSTTCTGCTGGGGSGTNGA
		P920(-)	TCSGGSGTSSWSGCNCC

7.2 In dieser Arbeit verwendete genspezifische PCR-Primer

Zur Amplifikation von Fragmenten der Gene für die GPI und für Enzyme der IPP-Biosynthesewege aus verschiedenen, hier in alphabetischer Ordnung aufgeführten Organismen wurden die in Tabelle 10 aufgeführten genspezifischen Primer eingesetzt. Die Benennung der Primer entspricht den Laborbezeichnungen und beruht auf der laufenden Nummerierung aller in der Arbeitsgruppe verwendeten Primer.

Tab. 10: In dieser Arbeit verwendete genspezifische Primer

Organismus	Pathway	Gen	Primer	Sequenz (5'→ 3')
<i>Chondrus</i>	Glykolyse	GPI _{cyt}	P735(+)	CGCTTGACGCACTGAAG
			P736(-)	AGCATCGTAGTCGACGGGTTG
		GPI _{pla}	P731(+)	CGACGGCATCATCCTTGACTAC
			P732(-)	CGTTGAAACCCTCCACTTT
<i>Cyanophora</i>	Glykolyse	GPI	P878(+)	GACCGCGCTGTGCTGCACATGGCTC
			P879(-)	CGGACCTGCGTGGCGAGGACCTTG
<i>Emiliana</i>	Glykolyse	GPI	P669(+)	CTGTGCATCCTCGCTTGTAGC
			P670(-)	GCCTTGAAGTGGTTCATCAGG
	MVA	HMGS	P624(+)	AAGGATAACATGGCGAGACG
			P625(-)	CGAGAGCAGGTTCATGTAGAGC
		HMGR	P639(+)	GCCGTAGTCGAGAAGGTCTG
			P640(-)	ATCGTGGTCTCATGTGTCGTC
		MK	P616(+)	GTCTGCCGCCTTCAGTGT
			P617(-)	GCGCCAGTCAGCTTTGTG
		MDD	P571(+)	AGTTCCACGCCACCTGCCT
			P572(-)	CGTTCACCTCCGCGCCACCT
	MEP	DXS	P631(+)	AACGACCTCAAGGGCTTCTC
			P632(-)	TTGCCTTTGTCTAGTCTTGATGT
			P635(+)	AATCGTTTCGACCTCGCCTAC
			P636(-)	ACAGCACAGATAGGGAGAGACC
			P637(+)	ACATCAAGACTGACAAAGGCAA
			P638(-)	GTAGGCGAGGTCTGAACGATT
		MCT	P620(+)	CAGTGGGACCTGGAGCTG
			P621(-)	GAGCTTGAGGTTGGTGTACTCG
		CMK	P622(+)	AGTGGGTGAGGTGGAGGAC
			P623(-)	GAAGACGGAGGCTGTGGATA

7 Anhang

		MECPS	P628(+)	GCTCTCCTCCTGGGATGTCT
			P629(-)	CGCTGCTGCTCACCCTCA
		HDS	P822(+)	ATGAGGCGGCTCGGGTGGGACTAC
			P837(-)	CCTCCTCCTCCTCGGGCTCCTTCC
<i>Mesostigma</i>	Glykolyse	GPI	P870(-)	CGCTCCATGTGTTTCGTACCCGTAC
			P872(+)	CCCCCGATCTCGTCCCCCACAAG
	MVA	HMGS	P804(-)	CTCGACCCAGTTCATTGC
			P890(+)	GACAACATCAACGCCTGCTACGG
			P916(+)	CCAAAGAGGAGACGTTACCAATC
<i>Phaeo-dactylum</i>		eGFP	P847-eGFP(-)	GCCGTAGGTGGCATCGCC
	MVA	HMGS	P886(+)/ <i>EcoRI</i>	ATCGAATTCATGACGGTGACTATCAGCAGTAG
			P888(-)/ <i>NcoI</i>	TGACCATGGGCACGTAGACGGTTTCGCCATTG
	MEP	DXS	P813(+)	CCACCCATCAAAGAATCCGTCCG
			P809(-)	CACAGCGTGTGTTCAGCAATCCC
			P844(+)/ <i>EcoRI</i>	GTCGAATTCATGTGTTTGGGTATCTTTTC
			P845(-)/ <i>NcoI</i>	TGACCATGGATTCCAGGACTTCCCAACG
		DXR	P815(+)	AGTCGCACTTTCTCTCCTACATCG
			P816(-)	CCTGCACGGCACGAGGGTTGTCTT
			P848(+)/ <i>EcoRI</i>	GTCGAATTCATGCGGTTAACGGAAGTGTG
			P849(-)/ <i>NcoI</i>	TACCCATGGACGCGACTTTGGGAGA
<i>Prymnesium</i>	MEP	DXR	P772(+)	TGAAGCACCCCAACTGGTCCAT
			P773(-)	GGTTCGCAGAGGGGACATCACA
			P940(+)	TTCAAGTACTGATCTCCGTCTCAGC
			P941(-)	CCAAAGAGTCGAACTTCCCCGCTC

7.3 Accession Nummern der in dieser Arbeit etablierten Gensequenzen

7.3.1 Accession Nummern der etablierten Glucose-6-phosphat Isomerasen

Tab. 11: Accession Nummern der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Sequenzen der Glucose-6-phosphat Isomerasen (GPI). a: Grauvogel *et al.* 2007. b: Teich *et al.* 2007. DA: bereits im Rahmen der Diplomarbeit (Grauvogel 2003) etablierte, in der hier vorliegenden Arbeit analysierte Sequenzen. SAG: Sammlung für Algenkulturen, Göttingen.

Organismus	Referenz	Accession
<i>Cyanophora paradoxa</i> (Kies; SAG 45.84)	Kap. 3.3.2	DQ812896 ^{a, b}
<i>Cyanophora paradoxa</i> (Pringsheim; SAG 29.80)	Kap. 3.3.2	DQ812897 ^{a, b}
<i>Emiliana huxleyi</i> (Haptophyta)	Kap. 3.3.3	DQ812889 ^a
<i>Lingulodinium polyedrum</i> (Dinophyta)	Kap. 3.3.2	DQ812892 ^a
<i>Hanusia phi</i> (Cryptophyta)	Kap. 3.3.2	DQ812894 ^a
<i>Mesostigma viride</i> (Streptophyta)	Kap. 3.3.1	DQ873405 ^{a, b}
<i>Paramecium tetraurelia</i> (Ciliata)	Kap. 3.3.2	DQ812895 ^a
<i>Pavlova lutheri</i> (Haptophyta)	Teich 2002	DQ812890 ^a
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (Diatomeen)	DA	DQ812891 ^a
<i>Porphyra yezoensis</i> (Rhodophyta)	DA	DQ812900 ^{a, b}
<i>Pyrocystis lunula</i> (Dinophyta)	Kap. 3.3.2	DQ812893 ^a

7.3.2 Accession Nummern der etablierten Gene für die IPP-Biosynthese

Tab. 12: Accession Nummern der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Sequenzen von Genen für den cytosolischen MVA- und den plastidären MEP-Weg der IPP-Biosynthese. c: Grauvogel und Petersen 2007. d: Grauvogel *et al.* 2006. n.a.: noch nicht annotiert. SAG: Sammlung für Algenkulturen, Göttingen.

Organismus	Gen	Referenz	Accession
<i>Chara vulgaris</i> (Streptophyta)	HMGS1 (cyt-1)	Kap. 3.4.2	EF119238 ^c
	HMGS2 (cyt-1)	Kap. 3.4.2	EF119239 ^c
<i>Cyanophora paradoxa</i> (Pringsheim, SAG 29.80)	HMGS (cyt-1)	Kap. 3.4.3	EF119234 ^c
	HMGR (cyt-2)	Kap. 3.4.3	EF119235 ^c
	MK (cyt-3)	Kap. 3.4.3	EF119236 ^c
	MDD (cyt-5)	Kap. 3.4.3	EF119237 ^c
<i>Emiliana huxleyi</i> (Haptophyta)	HMGS (cyt-1)	Kap. 3.5.10	n. a. ^c

7 Anhang

	HMGR (cyt-2)	Kap. 3.5.10	n. a.
	MK (cyt-3)	Kap. 3.5.10	n. a.
	MDD (cyt-5)	Kap. 3.5.10	n. a.
	DXS (pla-1)	Kap. 3.5.10	n. a.
	MCT (pla-3)	Kap. 3.5.10	n. a.
	CMK (pla-4)	Kap. 3.5.10	n. a.
	MECPS (pla-5)	Kap. 3.5.10	n. a.
	HDS (pla-6)	Kap. 3.5.10	n. a.
	HDR (pla-7)	Kap. 3.5.10	n. a.
<i>Hanusia phi</i> (Cryptophyta)	DXR (pla-2)	Kap. 3.5.8	DQ863279 ^d
<i>Mesostigma viride</i> (Streptophyta)	HMGS (cyt-1)	Kap. 3.4.4	EF119231 ^c
	HMGR (cyt-2)	Kap. 3.4.3	EF119232 ^c
	MDD (cyt-5)	Kap. 3.4.3	EF119233 ^c
	DXS (pla-1)	Kap. 3.4.3	EF119224 ^c
	DXR (pla-2)	Kap. 3.4.3	EF119225 ^c
	MCT (pla-3)	Kap. 3.4.3	EF119226 ^c
	CMK (pla-4)	Kap. 3.4.3	EF119227 ^c
	MECPS (pla-5)	Kap. 3.4.3	EF119228 ^c
	HDS (pla-6)	Kap. 3.4.3	EF119229 ^c
	HDR (pla-7)	Kap. 3.4.3	EF119230 ^c
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> (Diatomeen)	HMGR	Kap. 3.5.7	n.a.
	DXR (pla-2)		DQ863280 ^d
<i>Porphyra yezoensis</i> (Rhodophyta)	DXS (pla-1)	Kap. 3.4.6	n. a.
	DXR (pla-2)	Kap. 3.4.6	DQ863281 ^d
	HDS (pla-6)	Kap. 3.4.6	n. a.
	HDR (pla-7)	Kap. 3.4.6	n. a.
<i>Prymnesium parvum</i> (Haptophyta)	DXR (pla-2)	Kap. 3.5.9	DQ863277 ^d
<i>Pyrocystis lunula</i> (Dinophyta)	DXR (pla-2)	Kap. 3.5.3	DQ863278 ^d

7.4 Sequenz des RT-PCR-Amplifikats der plastidären GPI aus *Mesostigma viride*

Aus *Mesostigma viride* wurde durch RT-PCR folgendes Genfragment der plastidären GPI amplifiziert. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf die Referenzsequenz aus *Arabidopsis thaliana* (NM118595).

```

                                420
T   V   Y   G   N   K   G   S   T   D   Q   H   A   Y   V   Q   Q   L   R   D
ACG GTC TAC GGC AAC AAG GGC AGC ACG GAC CAG CAC GCC TAC GTG CAG CAG CTG CGC GAC
                                P096(+)                                50

                                440
G   V   P   N   F   F   A   T   F   I   E   V   L   R   D   R   K   L   G   N
GGC GTC CCC AAC TTC TTC GCG ACC TTC ATC GAG GTG CTG CGC GAC CGC AAG CTG GGC AAT
                                100

                                460
D   W   E   L   E   P   G   V   T   C   G   D   Y   L   F   G   F   L   Q   G
GAC TGG GAG CTG GAG CCG GGC GTG ACG TGC GGC GAC TAC CTG TTT GGC TTC CTG CAG GGC
                                150

                                480
T   R   S   A   L   Y   S   A   G   R   E   S   I   T   L   T   L   D   E   V
ACG CGC TCG GCG CTG TAC TCG GCG GGG CGC GAG AGC ATC ACG CTG ACC CTG GAC GAG GTG
                                200

                                500
T   P   R   T   V   G   A   L   I   A   L   Y   E   R   A   V   G   Y   Y   A
ACC CCA CGC ACA GTG GGC GCG CTC ATC GCG CTG TAC GAG CGG GCG GTC GGG TAC TAC GCG
                                250                                300

                                520
L   L   V   N   I   N   A   Y   H   Q   P   G   V
CTG CTG GTC AAC ATC AAC GCG TAC CAC CAG CCC GGC GTG GA
                                P097(-)                                341

```

7.5 Sequenzen der RT-PCR-Amplifikate von Genen des plastidären MEP-Weg der IPP-Biosynthese aus *Cyanophora paradoxa*

Folgende partielle Sequenzen von Genen für den plastidären MEP-Weg der IPP-Biosynthese in *Cyanophora paradoxa* wurden im Rahmen dieser Arbeit durch RT-PCR mit den genannten Primern etabliert. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf die Referenzsequenzen aus *Arabidopsis thaliana* (Kap. 1.6)

7.5.1 Sequenz des RT-PCR-Amplifikats der DXR (pla-2) aus *Cyanophora*

```

                240                                250
E   H   W   A   I   F   Q   C   L   Q   G   F   P   P   D   A   L   R   R   I
GAG CAC TGG GCG ATC TTC CAG TGT CTC CAG GGT TTC CCG CCG GAT GCC CTT CGA AGG ATT
                P307(+)                                50

                260                                270
I   L   T   A   S   G   G   A   F   R   D   W   P   A   E   D   L   A   K   V
ATC CTC ACA GCT TCC GGG GGT GCC TTT CGC GAC TGG CCG GCG GAG GAC TTG GCG AAG GTG
                                100

                280                                290
T   V   A   D   A   L   T   H   P   N   W   D   M   G   A   K   I   T   V   D
ACA GTG GCT GAT GCG CTT ACG CAC CCA AAC TGG GAT ATG GGT GCA AAG ATC ACG GTG GAC
                                150

                300
S   A   T   M   M   N   K   G   L   E   V   I   E
AGC GCC ACG ATG ATG AAC AAG GGC CTG GAG GTG ATC GAG GC
                200                P308(-)                212

```

7 Anhang

7.5.2 Sequenz des RT-PCR-Amplifikats der MCT (pla-3) aus *Cyanophora*

```

                                160                                170
P   G   K   E   R   Q   D   S   V   Y   N   G   L   Q   E   I   D   R   N   R
CCC GGG AAG GAG CGC CAG GAT TCG GTG TAC AAT GGA CTG CAG GAA ATA GAC CGG AAC CGC
P409(+)                                50

                                180                                190
S   Q   L   V   A   V   H   D   S   A   R   P   L   V   E   R   D   S   V   R
TCG CAG CTG GTG GCA GTG CAC GAC TCG GCG CGG CCG CTC GTA GAG CGC GAC TCC GTC CGC
                                100

                                200                                210
L   V   F   R   E   G   A   H   Y   G   A   A   A   L   G   V   P   S   K   A
CTC GTC TTC CGC GAG GGC GCC CAC TAC GGC GCA GCC GCC CTC GGT GTT CCC AGC AAG GCC
                                150

                                220                                230
T   I   K   E   V   D   P   E   T   R   L   V   E   R   T   P   D   R   S   R
ACT ATC AAG GAA GTG GAC CCG GAG ACA CGG CTA GTG GAG CGG ACC CCG GAC CGC AGC CGC
                                200

                                240                                250
L   Y   E   I   Q   T   P   Q   V   I   R   P   K   I   L   Q   A   G   Y   D
CTC TAC GAG ATC CAG ACA CCA CAG GTC ATC CGT CCG AAG ATC CTG CAG GCG GGA TAC GAC
                                250                                300

                                260
K   V   H   A   G   D   T   E   G   K   P   L   E   V   T   D   D   V   T
AAG GTC CAC GCA GGT GAC ACA GAG GGC AAG CCC CTC GAA GTC ACC GAC GAC GTG ACC AT
                                P410(-)                                359

```

7 Anhang

7.5.3 Sequenz des RT-PCR-Amplifikats der MECPS (pla-5) aus *Cyanophora*

```

      110                                120
A   H   W   D   G   D   V   V   L   H   C   V   T   D   A   I   L   G   A   L
GCG CAC TGG GAC GGG GAT GTG GTG CTG CAC TGC GTG ACT GAC GCG ATC CTG GGC GCC CTC
      P413(+)                                50

      130                                140
S   L   P   D   I   G   Q   L   F   P   D   N   D   P   R   Y   K   G   A   D
TCG CTC CCG GAC ATC GGG CAG CTC TTC CCT GAC AAC GAC CCG CGC TAC AAG GGC GCC GAC
                                100

      150                                160
S   R   M   F   L   E   E   A   A   R   R   M   R   A   A   G   Y   E   V   G
TCG CGC ATG TTC CTC GAG GAG GCC GCC CGC CGC ATG CGC GCC GCC GGC TAC GAG GTG GGC
                                150

      170                                180
N   L   D   V   T   I   I   L   E   R   P   K   L   S   P   H   K   A   A   I
AAC CTC GAC GTG ACG ATC ATC CTG GAG CGC CCG AAG CTC TCG CCG CAC AAG GCC GCG ATC
                                200

      190                                200
R   Q   N   I   A   D   M   I   G   A   D   V   E   R   V   N   V   K   A   Q
CGA CAG AAC ATC GCC GAC ATG ATC GGC GCC GAC GTC GAG CGC GTC AAC GTC AAG GCC CAG
      250

      210
T   H   E   K
ACG CAC GAG AAG GT
      P414(-)                                314

```

7.5.4 Sequenz des RT-PCR-Amplifikats der HDS (pla-6) aus *Cyanophora*

```

      190                                200
P   G   N   F   A   D   R   R   A   Q   F   E   Q   L   V   Y   D   D   A   A
CCG GGG AAC TTC GCC GAC CGC CGC GCG CAG TTT GAG CAG CTG GTC TAC GAC GAC GCG GCG
      P488(+)                                50

      210                                220
Y   A   A   E   L   E   H   I   E   E   V   F   T   P   L   V   E   K   C   K
TAT GCG GCC GAG CTG GAG CAC ATC GAG GAG GTG TTC ACC CCT CTG GTG GAG AAG TGC AAG
                                100

      230                                240
K   L   G   R   A   M   R   I   G   T   N   H   G   S   L   S   D   R   I   M
AAG CTG GGC CGC GCG ATG CGC ATC GGC ACC AAC CAC GGG TCG CTG TCT GAC CGC ATC ATG
                                150

      250                                260
S   F   Y   S   D   S   P   A   G   M   V   E   S   A   V   E   F   A   N   I
AGC TTC TAC AGT GAC TCC CCC GCT GGC ATG GTG GAG TCG GCG GTC GAG TTT GCC AAC ATC
                                200

      270                                280
C   R   K   N   D   F   H   N   F   V   F   T   M   K
TGC CGC AAG AAC GAC TTC CAC AAC TTC GTC TTC ACG ATG AAG GC
      250                                P489(-)                                284

```


7 Anhang

7.5.5 Sequenz des RT-PCR-Amplifikats der HDR (pla-7) aus *Cyanophora*

```

120                               130
Y   G   F   C   W   G   V   E   R   A   V   A   M   A   Y   E   T   R   K   H
TAC GGC TTC TGC TGG GGG GTT GAG CGC GCC GTG GCG ATG GCG TAC GAG ACG CGG AAG CAC
P919(+)                               50

140                               150
F   P   T   Q   K   L   W   I   T   N   E   I   I   H   N   P   F   V   N   Q
TTC CCG ACG CAG AAG CTG TGG ATC ACG AAC GAG ATT ATT CAC AAC CCC TTC GTG AAC CAG
100

160                               170
Q   L   K   D   M   G   V   E   F   I   E   L   Q   N   N   E   K   D   F   S
CAG CTG AAG GAC ATG GGC GTG GAG TTC ATC GAG CTA CAG AAC AAC GAG AAG GAC TTC AGC
150

180                               190
G   V   Q   N   N   D   V   V   I   L   P   A   F   G   A   S   V   Q   E   M
GGC GTG CAG AAC AAC GAC GTC GTC ATT CTG CCG GCC TTC GGC GCG AGC GTG CAG GAG ATG
200

200                               210
Q   L   L   S   D   K   G   V   T   I   V   D   T   T   C   P   W   V   A   K
CAG CTG CTC AGC GAC AAG GGT GTC ACC ATT GTT GAC ACC ACC TGC CCG TGG GTC GCC AAG
250                               300

220                               230
V   W   T   S   V   E   K   H   K   K   T   S   S   T   S   I   I   H   G   K
GTC TGG ACT TCG GTC GAG AAG CAC AAG AAG ACC TCC TCG ACC TCC ATC ATC CAC GGC AAG
350

240                               250
Y   A   H   E   E   T   V   A   T   A   S   F   A   G   T   Y   L   I   V   L
TAC GCG CAC GAG GAG ACG GTG GCG ACG GCC TCG TTC GCG GGG ACG TAC CTG ATC GTG CTC
400

260                               270                               280
N   M   D   E   A   E   Y   V   A   N   Y   I   L   N   G   G   D   R   E   E
AAC ATG GAC GAG GCT GAG TAC GTC GCG AAC TAC ATC CTC AAC GGC GGC GAC CGG GAG GAG
450

290                               300
F   M   K   K   F   A   K   A   M   S   K   G   F   D   P   D   R   D   L   V
TTC ATG AAG AAG TTT GCG AAG GCG ATG TCC AAG GGC TTC GAC CCC GAC CGC GAC CTC GTC
500

310                               320
R   A   G   V   A   N   Q   T   T   M   L   K   G   E   T   E   A   I   G   K
CGG GCG GGC GTG ACG AAC CAG ACG ACG ATG CTG AAG GGC GAG ACT GAG GCG ATC GGC AAG
550                               600

330                               340
L   F   E   R   T   M   M   Q   K   Y   G   P   D   K   L   Q   E   H   F   I
CTC TTC GAG CGC ACC ATG ATG CAG AAG TAC GGC CCC GAC AAG CTG CAG GAG CAC TTC ATC
650

350                               360
A   F   N   T   I   C   D   A   T   Q   E   R   Q   D   A   M   F   E   L   V
GCG TTC AAC ACG ATC TGC GAC GCG ACC CAG GAG CGC CAG GAC GCG ATG TTC GAG CTC GTG
700

370                               380
D   D   K   L   D   L   M   L   V   V   G   G   Y   N   S   S   N   T   S   H
GAC GAC AAG CTC GAC CTC ATG CTC GTC GTC GGC GGC TAC AAC TCC TCC AAC ACC TCC CAC
750
```

7 Anhang

390 400
L Q E T A V H R K I P S Y H I D S A A R
CTC CAG GAG ACC GCC GTC CAC CGC AAG ATC CCC TCC TAC CAC ATC GAC TCG GCG GCG CGC
800

410 420
I R G P A E I E Y Q P L F A N T L E V T
ATC CGC GGC CCC GCC GAG ATC GAG TAC CAG CCC CTC TTC GCC AAC ACC CTC GAG GTC ACC
850 900

430 440
K Y W L P A K G P L T I G I T S G A T T
AAG TAC TGG CTC CCC GCC AAG GGC CCC CTC ACC ATC GGC ATC ACC TCC **GGC GCC ACC ACC**
P920(-)

P
CCG GA
965

7.6 TRACE Identity (TI) Nummern der genomischen TRACE-Files aus *Emiliana huxleyi*

Aus folgenden NCBI TRACE-Files wurden die genomischen Sequenzen der Gene für die GPI und die Enzyme der IPP-Biosynthese aus dem Haptophyten *Emiliana huxleyi* assembliert. Die Reihenfolge der TRACE-Files entspricht der Position ihrer Sequenzdaten innerhalb des vollständigen Gens ausgehend vom 5' bis zum 3'-Ende.

Tab. 13: TRACE Identity (TI) Nummern der zur Etablierung von Sequenzen aus *Emiliana huxleyi* verwendeten NCBI TRACE Files.

Pathway	Gen	TI Nummern
Glykolyse	GPI	628689017; 601391402; 604795863; 576118350; 577456850; 577897207; 577750423; 577373054; 576430375; 604843288; 604820675
MVA	HMGS	577916523; 576853684; 575203757; 576849683; 577781400; 577312569
	HMGR	608904039; 577582326; 577751752; 576889613; 577917285
	MK	577785695; 601764868; 610133333; 604822825; 601836431; 640797477
	PMK	–
	MDD	632633125; 577848582; 577547767; 577788735; 576325109
MEP	DXS	576419651; 601395704; 601567029; 614123031; 601614682; 576334280; 576492997
	DXR	576492997; 577819732; 628518903; 577808595; 624457103; 577987210
	MCT	577830765; 577710005; 577919753; 610112478; 601424293; 576907420
	CMK	577300327; 575699077; 578096420
	MECPS	577952378; 624594657
	HDS	640693962; 610318686; 577497892; 562199603; 576826610; 577484960; 575608223; 624635478
	HDR	610097330; 576235117; 655258067; 604901931; 577497607

7.7 Sequenzen der in *Phaeodactylum* transformierten eGFP-Reporter-Gen-Konstrukte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Reporter-Gen-Konstrukte aus eGFP und den davor klonierten 5'-Termini der Gene für die HMGR (cyt-2), der DXS (pla-1) und der DXR (pla-2) hergestellt. Die Integration in das Kern-Genom der Diatomee wurde anschließend durch spezifische PCR-Amplifikation des Konstrukts aus der genomischen DNA der Transformanten nachgewiesen. Bei den dafür eingesetzten Primern handelt es sich um einen eGFP-spezifischen reverse (-)-Primer, sowie jeweils den genspezifischen forward-Primer inklusive der *EcoRI*-Schnittstelle, der zuvor für die Amplifikation des zu transformierenden Fragments verwendet worden war. Die Amplifikate bestehen folglich aus der vollständigen transformierten 5'-terminalen Sequenz der HMGR, der DXS oder der DXR sowie dem 5'-Bereich des eGFP-Gens. Die Sequenzen dieser Kontroll-Amplifikate und die für die Herstellung und die Kontrolle der Konstrukte verwendeten Primer sind im Folgenden aufgeführt. Dabei bezieht sich die Nummerierung der Aminosäuren (AS) jeweils auf die Sequenz des Referenz-Proteins aus *Arabidopsis* (Kap. 1.6). Schwarze AS gehören zur zu analysierenden N-terminalen Sequenz aus *Phaeodactylum*, grüne AS sind Teil des eGFP.

7.7.1 Sequenz des Kontroll-Amplifikats des HMGR-Konstrukts

```

      Start
      M   T   V   T   I   S   S   S   I   S   R   S   I   G   S   S
TC GAA TTC ATG ACG GTG ACT ATC AGC AGT AGT ATT AGT AGA AGT ATT GGT AGT AGT
      P886(+)/EcoRI
                                     50

T   T   A   P   T   L   G   M   Q   V   D   A   L   V   Q   Q   M   D   N   L
ACG ACT GCC CCA ACA CTG GGA ATG CAG GTG GAT GCC CTT GTC CAA CAA ATG GAT AAC TTG
                                     100

S   S   T   Q   L   Y   G   L   I   V   G   L   T   I   L   V   S   F   V   L
AGC AGT ACG CAG TTG TAC GGA TTG ATT GTT GGT TTG ACC ATT CTC GTC TCC TTT GTG TTG
                                     150

L   G   S   S   A   D   I   P   V   S   L   R   D   T   T   K   E   T   S   S
CTC GGG TCT TCC GCG GAC ATT CCC GTT TCT CTT CGA GAC ACT ACC AAA GAG ACG TCG TCC
                                     200

S   S   S   T   P   R   K   T   T   T   V   S   S   S   S   N   R   G   P   E
TCC TCC TCC ACA CCC CGC AAG ACA ACC ACG GTG TCG TCG TCG TCG AAT CGG GGA CCG GAG
                                     250

P   R   W   H   I   F   T   Y   V   N   Y   A   I   V   A   C   F   V   A   S

```

7 Anhang

CCG CGC TGG CAC ATC TTT ACT TAC GTC AAT TAC GCC ATT GTG GCG TGC TTT GTC GCC TCC
300 350

V A E F G R N A S A Y L A A D D N V V L
GTT GCA GAA TTT GGA CGC AAC GCT TCG GCG TAC CTT GCT GCC GAC GAC AAC GTC GTG CTA
400

Y F L V A W S V F L C Y F F G F F G V S
TAC TTT CTC GTT GCT TGG AGC GTC TTT TTG TGC TAC TTT TTT GGT TTC TTT GGT GTC TCC
450

F V H D A D A A V A S P T P T K P T V R
TTT GTC CAC GAC GCG GAC GCT GCG GTC GCG AGT CCC ACA CCA ACC AAG CCC ACG GTC CGC
500

D S I S T K T S A S N T L S A R H P P A
GAC TCT ATT TCC ACC AAG ACC AGC GCG TCC AAC ACT CTT TCC GCT CGG CAT CCT CCC GCC
550

P S A P V C S D P S S F T P I H T S K T
CCG TCG GCA CCC GTA TGC AGT GAT CCC TCC AGT TTC ACA CCA ATC CAT ACC AGC AAG ACC
600 650

170
N I T T L D N A A I C Q L V L T N Q I K
AAC ATT ACG ACA CTA GAT AAC GCT GCC ATC TGT CAA CTG GTG CTC ACC AAT CAG ATC AAG
700

190
D H E L E K R L D A H R A V Q V R R L V
GAC CAC GAA CTC GAA AAA CGT CTC GAC GCG CAC CGC GCC GTG CAG GTC CGC CGT TTA GTC
750

210
V A H K L D T L E H I N A H A L D N L P
GTC GCC CAC AAA CTC GAC ACC TTG GAA CAC ATC AAC GCG CAC GCT CTC GAC AAT CTG CCC
800

230
S E P S L D Y T R V H G A N C E I V V G
TCG GAA CCT TCC CTC GAC TAC ACC CGC GTA CAC GGC GCC AAT TGC GAA ATC GTT GTG GGC
850

Y V P L P V G L V G P L T V N G E T V Y
TAC GTA CCC CTC CCG GTG GGA CTC GTC GGT CCC CTC ACG GTC **AAT GGC GAA ACC GTC TAC**
900 **P888(-)/NcoI**

260
V P **M V S K G E E L F T G V V P I L V E**
GTG CCC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC ACC GGG GTG GTG CCC ATC CTG GTC GAG
1000

L D G D V N G H K F S V S G E G E G D A
CTG GAC GGC GAC GTA AAC GGC CAC AAG TTC AGC GTG TCC GGC GAG GGC GAG **GGC GAT GCC**
1050 **P847-eGFP(-)**

T Y G
ACC TAC GGC
1085

7.7.2 Sequenz des Kontroll-Amplifikats des DXS-Konstrukts

Start

M C L G I F S I C T V N F L Q
 GTC GAA TTC ATG TGT TTG GGT ATC TTT TCT ATC TGC ACC GTC AAC TTC TTG CAG
 P844(+)/EcoRI 50

V A A F A P R A S L L V R K T N T F V K
 GTC GCT GCA TTT GCT CCC CGA GCG AGC CTT CTT GTC AGG AAA ACT AAC ACC TTT GTG AAA
 100

A E G T N G G V S G P P F S G P A V K P
 GCA GAA GGT ACC AAT GGG GGT GTT TCG GGA CCT CCG TTT TCG GGT CCG GCT GTC AAG CCA
 150

80
 I L D S V K Y P S D M K N L D M R Q L K
 ATT CTG GAC TCG GTG AAG TAT CCG TCT GAT ATG AAA AAT CTT GAC ATG AGG CAA CTC AAG
 200

100
 Q L A N E L R W E V L E S M V S K G E E
 CAG CTA GCC AAC GAA CTC CGT TGG GAA GTC TTG GAA TCC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG
 P845(-)/NcoI 250

L F T G V V P I L V E L D G D V N G H K
 CTG TTC ACC GGG GTG GTG CCC ATC CTG GTC GAG CTG GAC GGC GAC GTA AAC GGC CAC AAG
 300 350

F S V S G E G E G D A T Y G
 TTC AGC GTG TCC GGC GAG GGC GAG GGC GAT GCC ACC TAC GGC
 P847-eGFP(-)

7.7.3 Sequenz des Kontroll-Amplifikats des DXR-Konstrukts

Start

M R L T E L S V S L I V G S A
 GTC GAA TTC ATG CGG TTA ACG GAA CTG TCA GTC TCT CTT ATC GTC GGT TCG GCG
 P848(+)/EcoRI 50

A A F A P T T G I S A T R T T S A S T V
 GCA GCC TTT GCC CCG ACA ACT GGT ATC TCC GCG ACG CGG ACG ACT TCG GCC TCG ACT GTA
 100

R L Q L V S G S Q G T G E G W I D P S A
 CGC TTG CAA TTA GTC TCC GGT TCC CAA GGC ACC GGC GAA GGG TGG ATT GAT CCT TCG GCT
 150

P V N S K A S L E K T L S K S L E G S N
 CCC GTC AAT TCC AAA GCT TCT TTA GAA AAA ACG CTG TCC AAG TCT TTG GAA GGC AGC AAT
 200

7 Anhang

```

                                90
F   L   K   R   L   S   L   L   G   S   T   G   S   I   G   T   Q   T   L   E
TTC CTG AAA CGG CTT TCG CTT TTG GGT TCC ACC GGA TCG ATT GGG ACC CAG ACA CTC GAA
                                250

                                120
I   V   D   A   C   P   D   N   F   V   V   D   A   L   S   A   G   T   N   V
ATC GTC GAC GCT TGC CCT GAC AAC TTT GTC GTT GAT GCG CTT TCG GCG GGT ACC AAT GTA
                                300                                350

E   L   M   T   Q   Q   V   L   K   Y   S   P   K   V   A   S   M   V   S   K
GAG CTC ATG ACA CAG CAA GTG CTC AAG TAC TCT CCC AAA GTC GCG TCC ATG GTG AGC AAG
                                P849(-)/NcoI

G   E   E   L   F   T   G   V   V   P   I   L   V   E   L   D   G   D   V   N
GGC GAG GAG CTG TTC ACC GGG GTG GTG CCC ATC CTG GTC GAG CTG GAC GGC GAC GTA AAC
                                450

G   H   K   F   S   V   S   G   E   G   E   G   D   A   T   Y   G
GGC CAC AAG TTC AGC GTG TCC GGC GAG GGC GAG GGC GAT GCC ACC TAC GGC
                                500                                P847-eGFP(-)

```


7.8 Phylogenetische Analysen der Gene für Enzyme des MVA- und des MEP-Wegs der IPP-Biosynthese

Bei den hier dargestellten Stammbäumen handelt es sich um Maximum Likelihood-Analysen, die mittels des Programms "Treefinder" unter Verwendung des WAG+F+ Γ 4 Modells (Kap. 2.12) erstellt wurden. Die statistische Unterstützung der internen Verzweigungen wurde durch Bootstrap-Analysen mit 100 Wiederholungen errechnet.

Die Stammbäume der Analysen der HMGS (cyt-1) finden sich in Kapitel 3.7, die Stammbäume der DXR (pla-2) und der HDR (pla-7) in Kapitel 3.8. Die Analysen der übrigen vier Enzyme des MVA-Wegs und fünf Enzyme des MEP-Wegs sind hier aufgeführt. Dabei ist jeweils eine umfassende Analyse der Sequenzen aus allen verfügbaren Organismengruppen dargestellt, gefolgt von einer bzw. zwei Sub-Analysen eines Teilstammbaums. Die Topologien werden in Kapitel 3.7 (MVA-Weg) bzw. Kapitel 3.8 (MEP-Weg) näher erläutert.

Zur besseren Übersicht ist jede Abbildung zusätzlich in der linken oberen Ecke mit der Bezeichnung des jeweiligen Enzyms versehen.

7.8.1 Phylogenetische Analyse der HMGR (cyt-2)

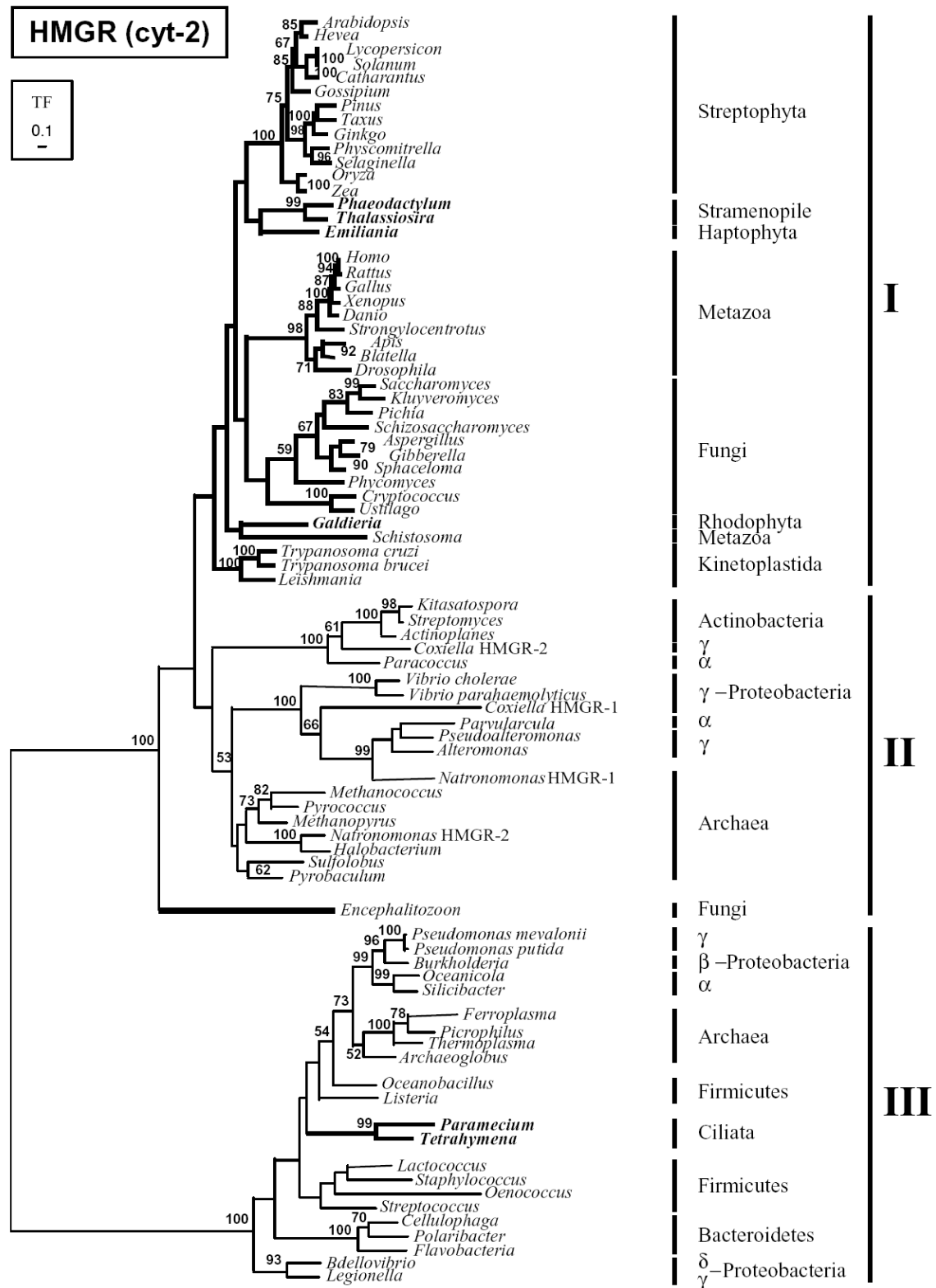


Abb. 32: Treefinder-Topologie der umfassenden ML-Analyse der HMGR (cyt-2) mit 82 Sequenzen. TF: Treefinder.

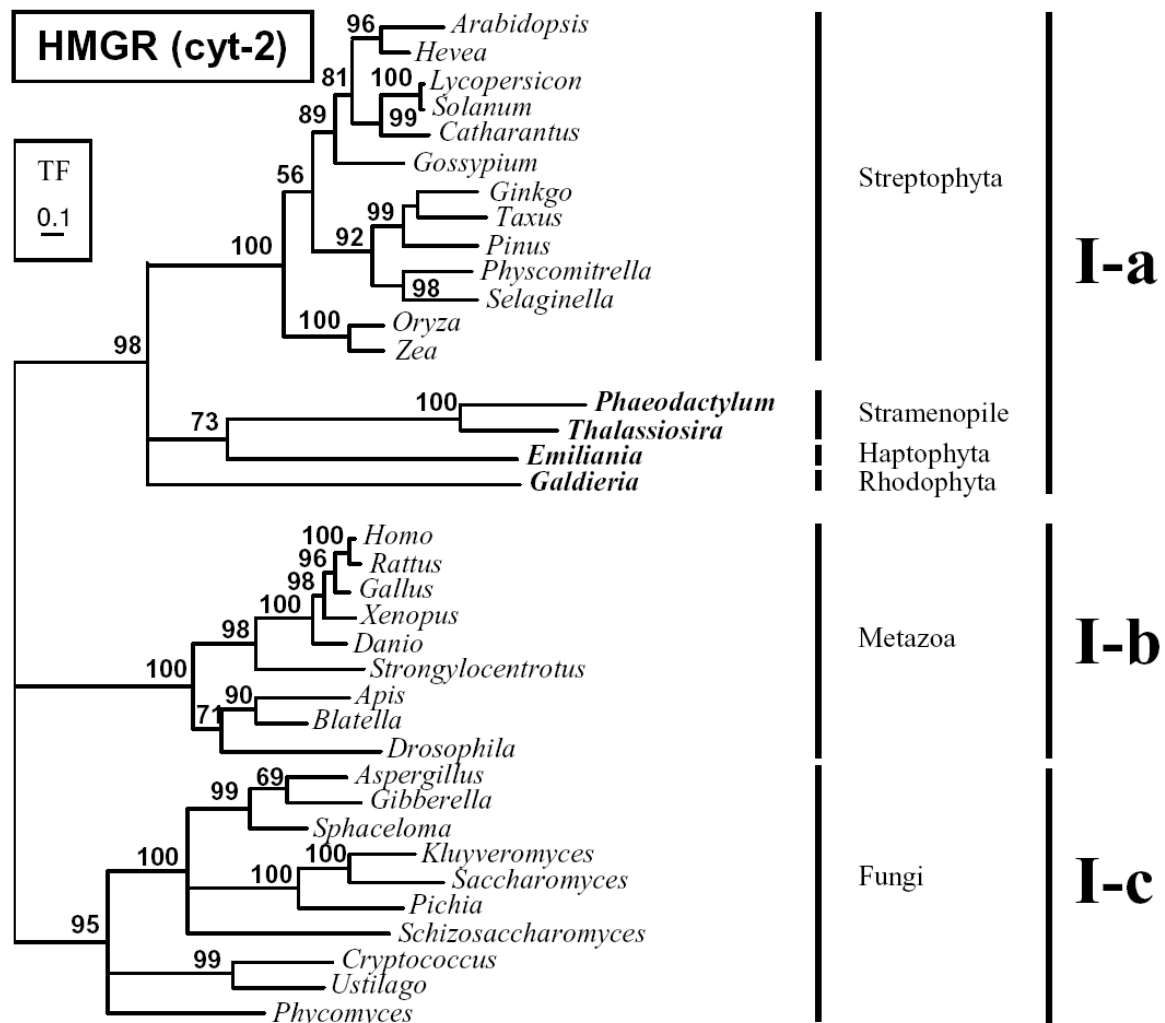


Abb. 33: Subanalyse der eukaryotischen Sequenzen des Teilstammbaums I der HMGR nach Ausschluss divergenter Sequenzen. TF: Treefinder.

Es lassen sich zwei grundlegend verschiedene Klassen der HMGR unterscheiden, von denen die eine (Klasse I) in Eukaryoten sowie auch in Eubakterien und Archaeen vorkommt, während die andere (Klasse II) prinzipiell auf die Prokaryoten beschränkt ist (Bochar *et al.* 1999). Auch in Abbildung 32 vorliegende umfassende Analyse von 43 eukaryotischen, 27 eubakteriellen und 12 archaealen Sequenzen zeigt diese tiefe Zweiteilung in Klasse I und Klasse II, die von 100% BP unterstützt wird. Dabei stellen die Sequenzen aus den Ciliaten *Paramecium* und *Tetrahymena* die einzigen eukaryotischen Sequenzen in der Klasse II dar, was auf einen sekundären Erwerb durch HGT hindeutet. Die Positionen von *Encephalitozoon* sowie auch von den Kinetoplastida innerhalb der Klasse I werden auch in einer Subanalyse dieses Teilstammbaums nicht aufgelöst (Daten nicht gezeigt).

7.8.2 Phylogenetische Analyse der MK (cyt-3)

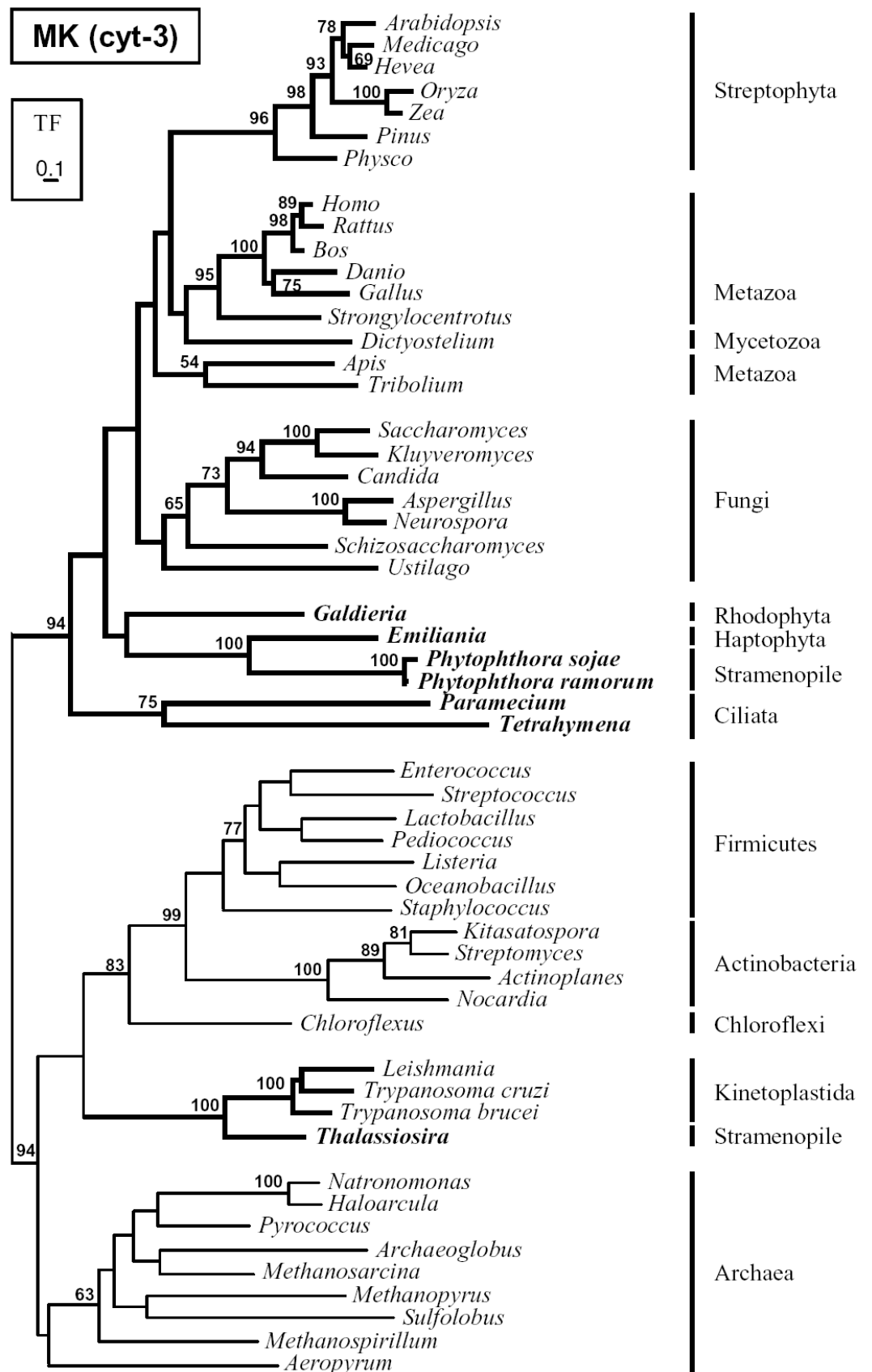


Abb. 34: Treefinder-Topologie der umfassenden ML-Analyse der MK (cyt-3) mit 54 Sequenzen. TF: Treefinder.

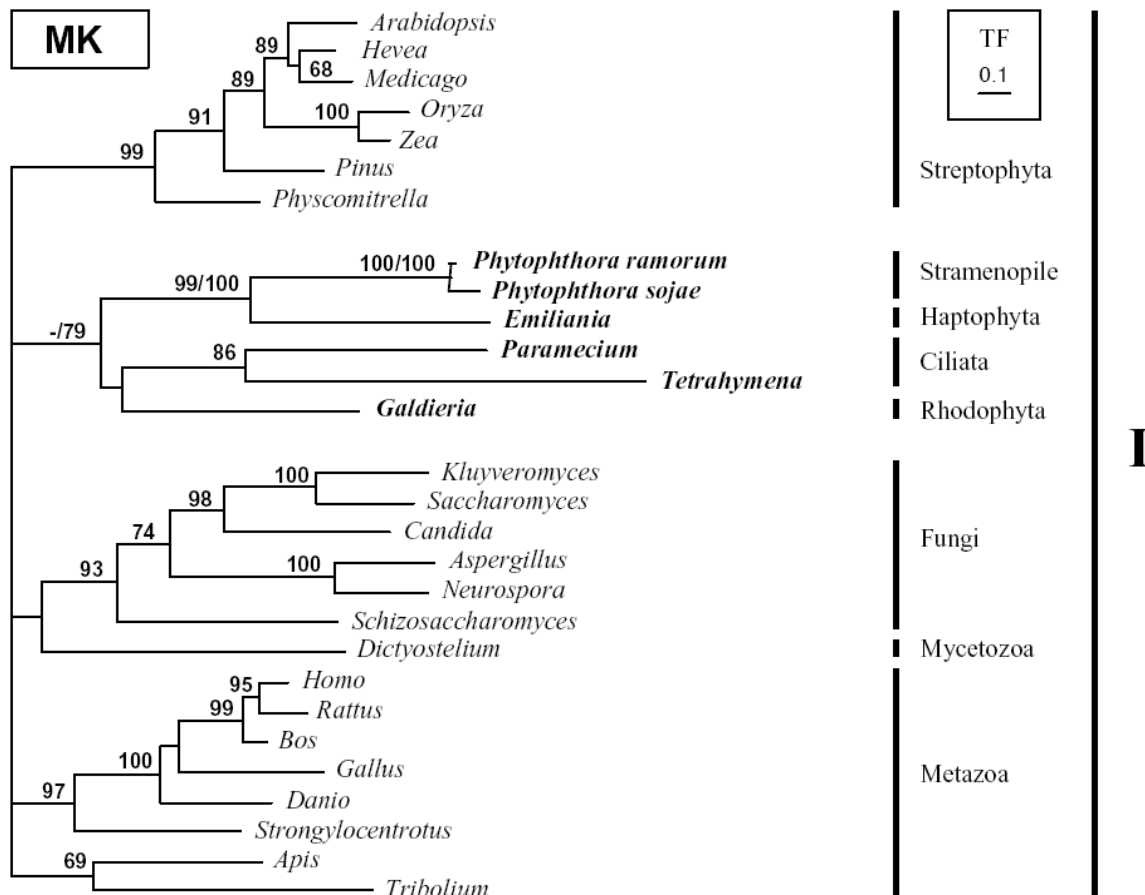


Abb. 35: Subanalyse der eukaryotischen Sequenzen des Teilstammbaums I der MK. TF: Treefinder.

Auch die umfassende Analyse der MK (cyt-3) in Abbildung 34 mit 33 Sequenzen aus Eukaryoten, 12 Sequenzen aus Eubakterien und 9 Sequenzen aus Archaeen zeigt eine tiefe Zweiteilung des Stammbaums in einen eukaryotischen Ast (Gruppe I) und einen prinzipiell prokaryotischen Ast (II). Die Sequenzen aus der Diatomee *Thalassiosira* sowie aus den Kinetoplastiden sind die einzigen eukaryotischen Sequenzen innerhalb der Gruppe II und wurden möglicherweise durch HGT erworben.

Die Analyse des Teilstammbaums I in Abbildung 35 zeigt eine gemeinsame Gruppierung von Rotalgen, Ciliaten, Haptophyten und Stramenopilen. Die Werte in diesem Ast geben zusätzlich zu der statistischen Unterstützung der hier dargestellten Topologie auch noch die Unterstützung der jeweiligen Verzweigung nach dem Ausschluss der divergenten Ciliaten-Sequenzen aus der Analyse an. Diese steigt für den gesamten Ast auf 79% BP.

7.8.3 Phylogenetische Analyse der PMK (cyt-4)

Die Analyse der PMK (cyt-4) in Abbildung 36 umfasst 30 eukaryotische, 16 eubakterielle und eine archaeale Sequenz. Sie zeigt eine distinkte Gruppierung der Sequenzen aus den Metazoa zum Ausschluss aller anderen Sequenzen, die mit einem Wert von 100% BP unterstützt wird. Die Sequenzen sind extrem divergent, was sich in einem sehr langen Ast dieser Gruppe zeigt. Möglicherweise handelt es sich bei den PMK-Sequenzen aus den verschiedenen hier analysierten Organismen um paraloge Gene. Die Analyse wird zusätzlich wahrscheinlich gestört von LBA-Effekten aufgrund divergenter prokaryotischer Sequenzen. Die Verzweigungen innerhalb des Stammbaums sind folglich generell schlecht aufgelöst. Die Sub-Analyse des Teilstammbaums I verdeutlicht zusätzlich die schnelle Evolutionsrate der Sequenzen aus *Galdieria* und *Tetrahymena*.

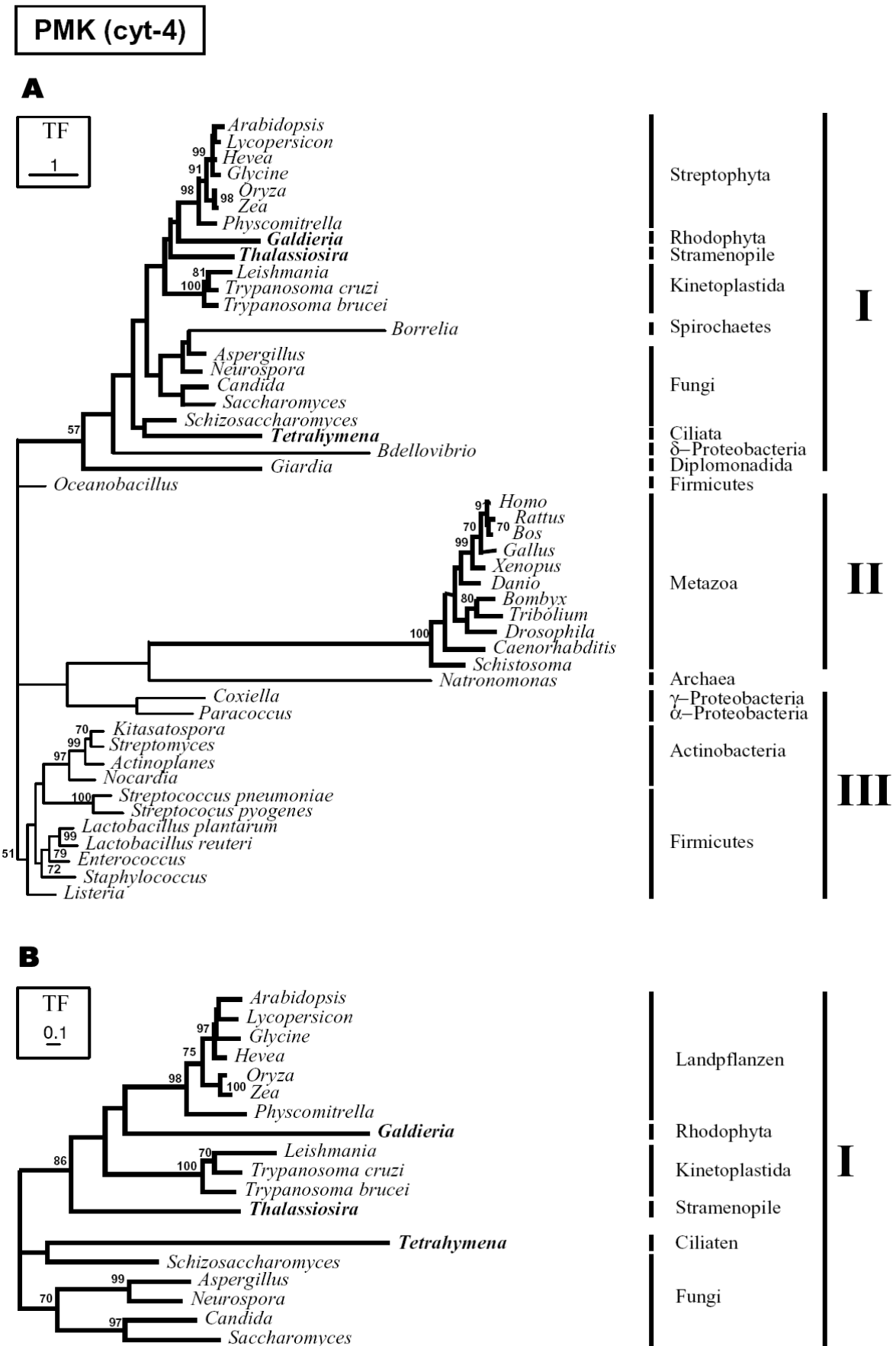


Abb. 36: Treefinder-Topologien der ML-Analysen der PMK (cyt-4). A: umfassende Analyse mit 47 Sequenzen. B: Sub-Analyse der eukaryotischen Sequenzen des Teilstammbaums I. TF: Treefinder.

7.8.4 Phylogenetische Analyse der MDD (cyt-5)

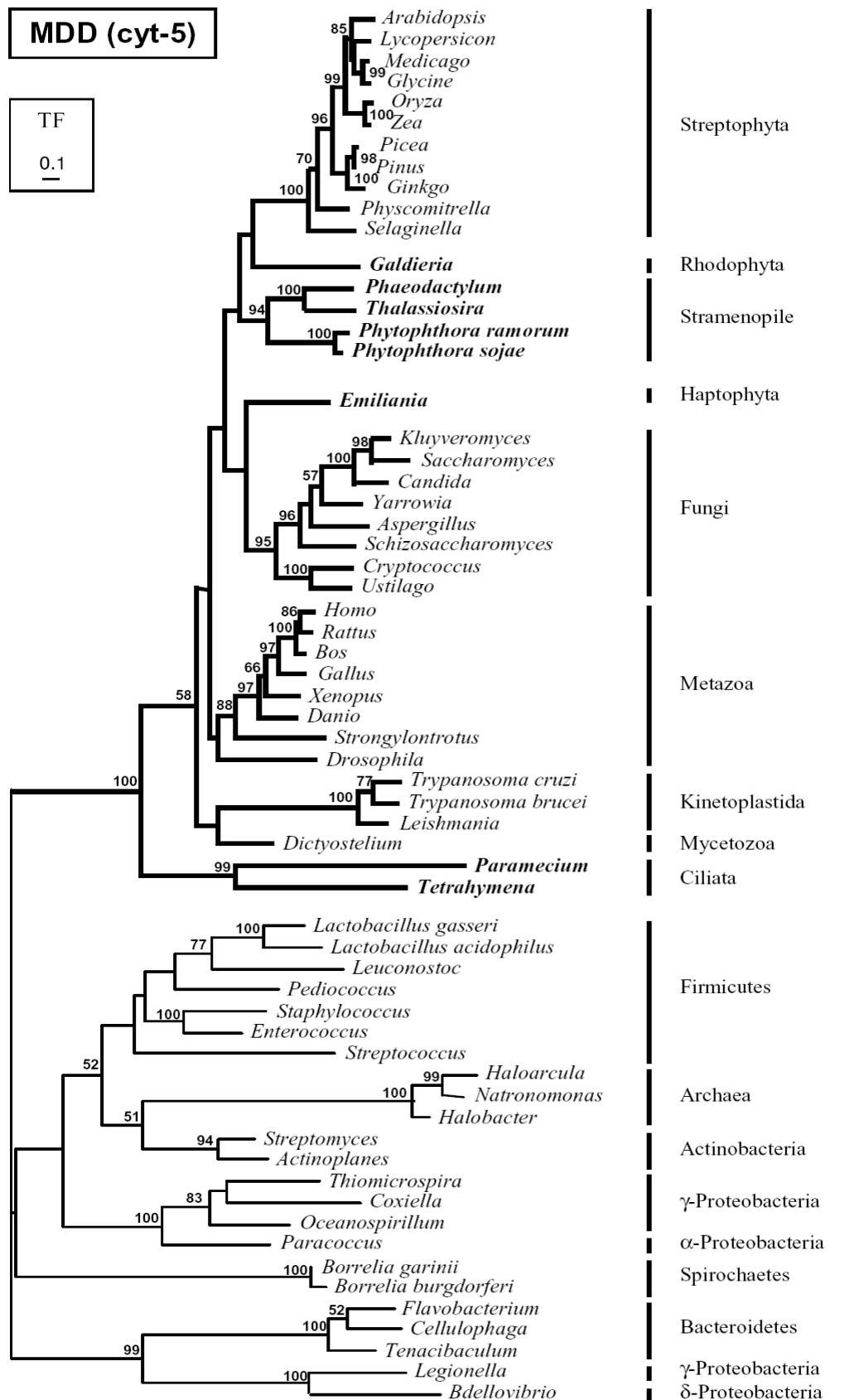


Abb. 37: Treefinder-Topologie der umfassenden ML-Analyse der MDD (cyt-5) mit 62 Sequenzen. TF: Treefinder.

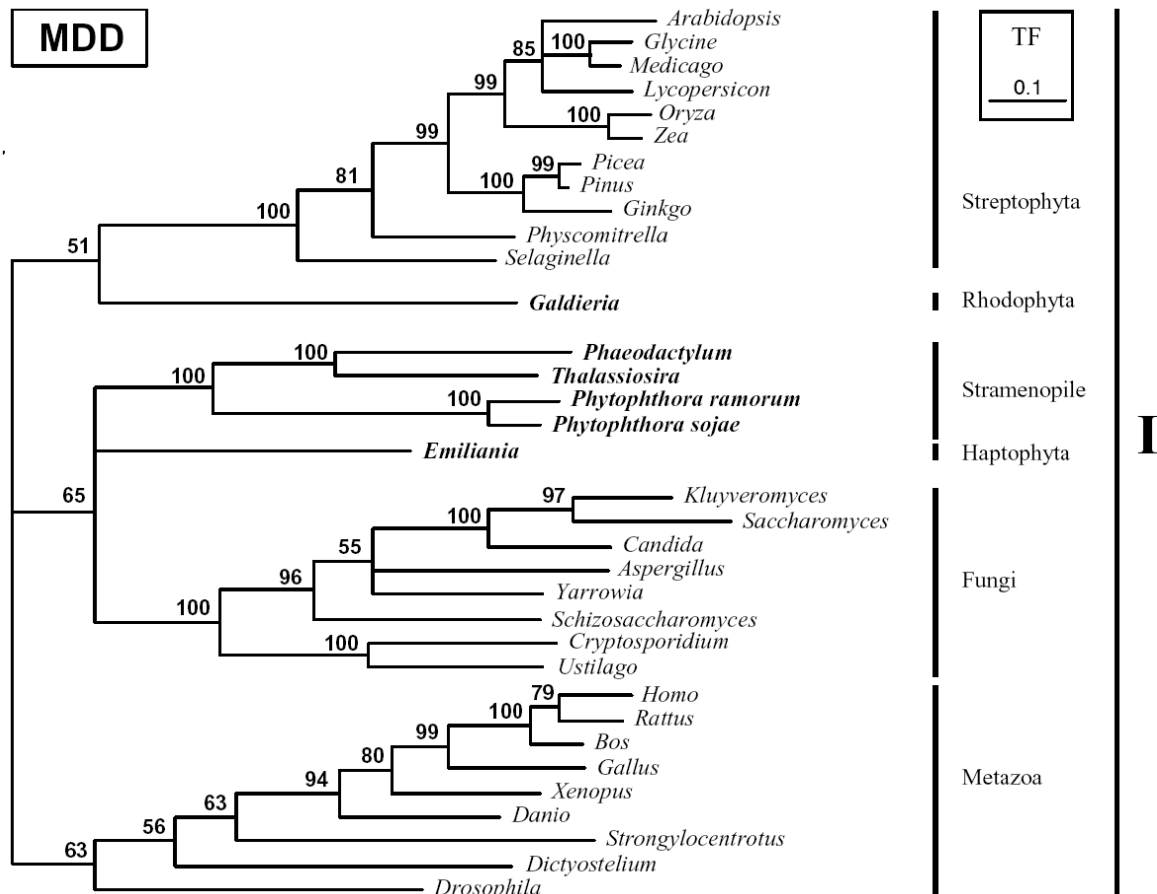


Abb. 38: Subanalyse des Teilstammbaums I der MDD nach Ausschluss divergenter Sequenzen. TF: Treefinder.

Die umfassende Treefinder-Topologie der Analyse der MDD (cyt-5) in Abbildung 37 enthält die Sequenzen aus 39 Eukaryoten, 20 Eubakterien und 3 Archaeen. Sie zeigt erneut eine tiefe Zweiteilung des Baums in einen eukaryotischen (Gruppe I) und einen prokaryotischen Ast (Gruppe II), die mit einem Wert von 100% BP unterstützt wird. Die Position der Ciliaten, der Kinetoplastida und des Schleimpilzes *Dictyostelium* innerhalb der Gruppe I lässt sich auch in Sub-Analysen mit reduzierten Datensätzen nicht bestimmen (Daten nicht gezeigt).

Die Analyse des Teilstammbaums I in Abbildung 38 kann auch die phylogenetischen Beziehungen zwischen den Streptophyten, Rhodophyten, Haptophyten und Stramenopilen nicht auflösen.

7.8.5 Phylogenetische Analyse der DXS (pla-1)

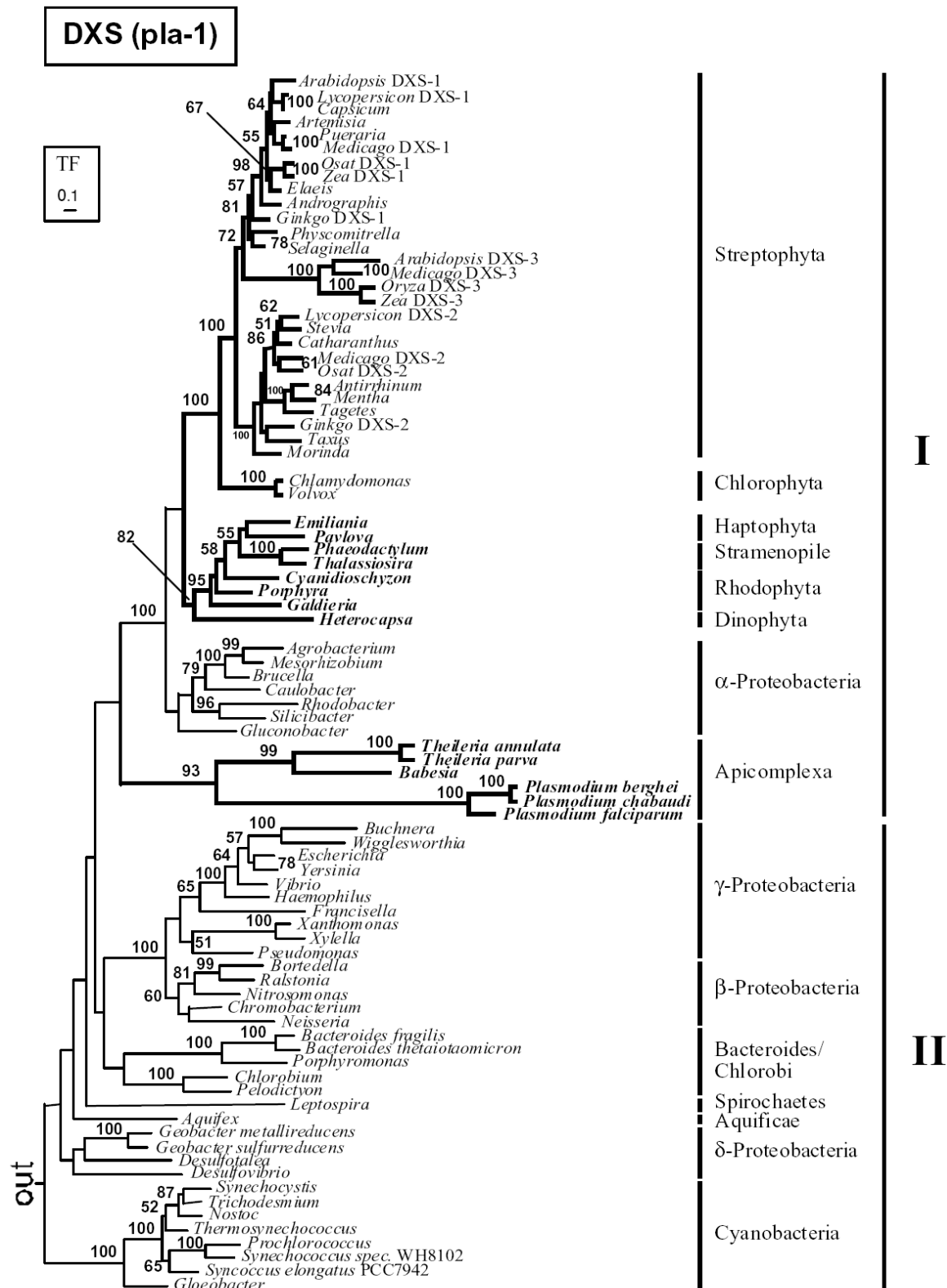


Abb. 39: Treefinder-Topologie der umfassenden ML-Analyse der DXS (pla-1) mit 114 Sequenzen. out: Außengruppe der divergenten Sequenzen aus Actinobacteria, Chlamydiales, Firmicutes und δ/ε-Proteobacteria. **TF:** Treefinder.

DXS (pla-1)

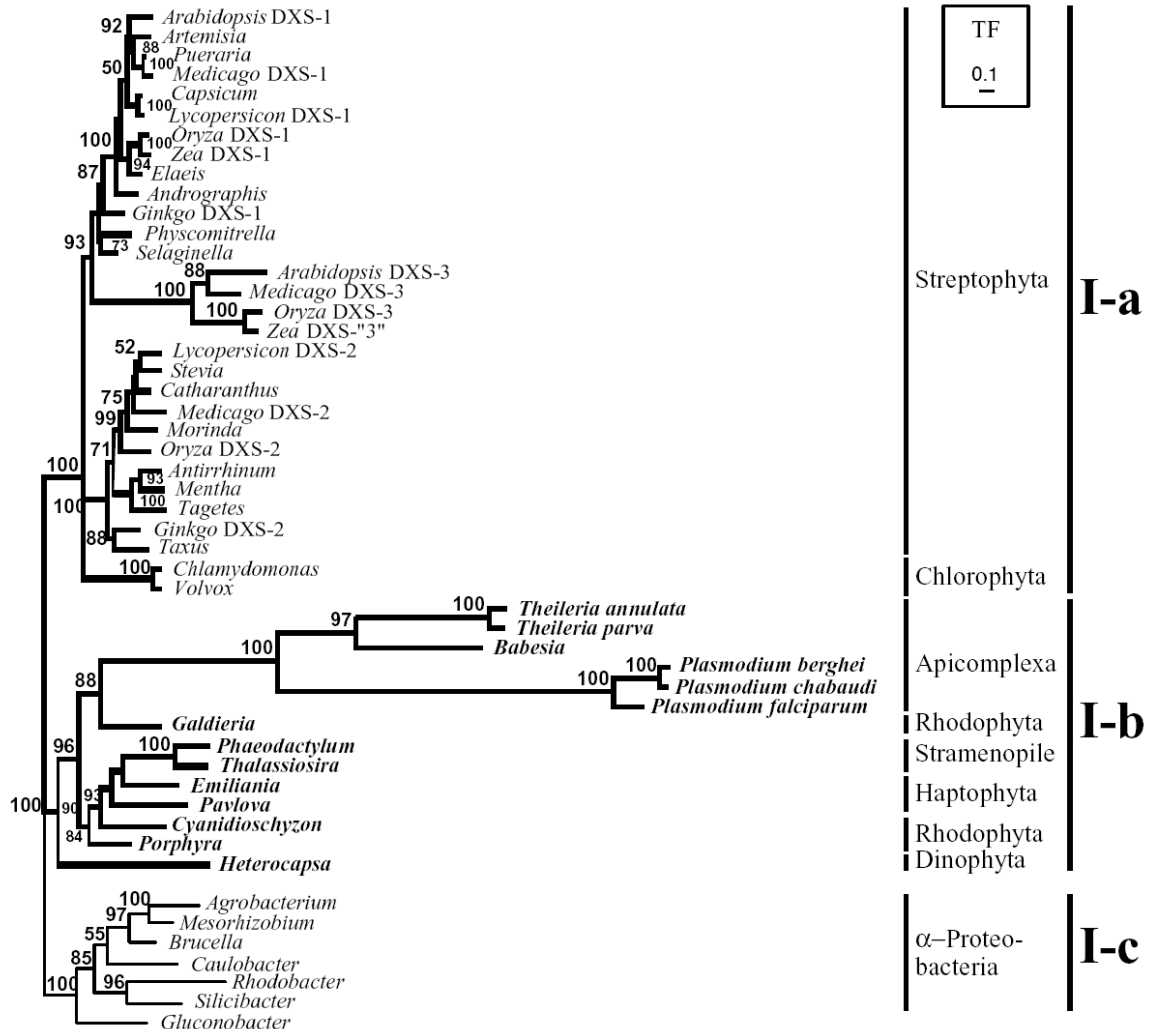


Abb. 40: Subanalyse des Teilstammbaums I der DXS. TF: Treefinder.

Die umfassende Analyse der DXS (pla-1) in Abbildung 39 enthält die Sequenzen aus 44 Eukaryoten und 70 Eubakterien. Als Außengruppe zum Wurzeln des Baums dienten die 29 divergenten Sequenzen aus Actinobacteria, Chlamydiales, Firmicutes und δ/ε-Proteobacteria. Die Topologie zeigt eine Zweiteilung des Baums in die Gruppe I mit photosynthetischen Eukaryoten und α-Proteobakterien und eine prokaryotische Gruppe II. Die multiplen Sequenzen der Streptophyten haben ihren Ursprung in mehreren rezenten Duplikationen. Eine Subanalyse der Gruppe I ist in Abbildung 40 dargestellt.

7.8.6 Phylogenetische Analyse der MCT (pla-3)

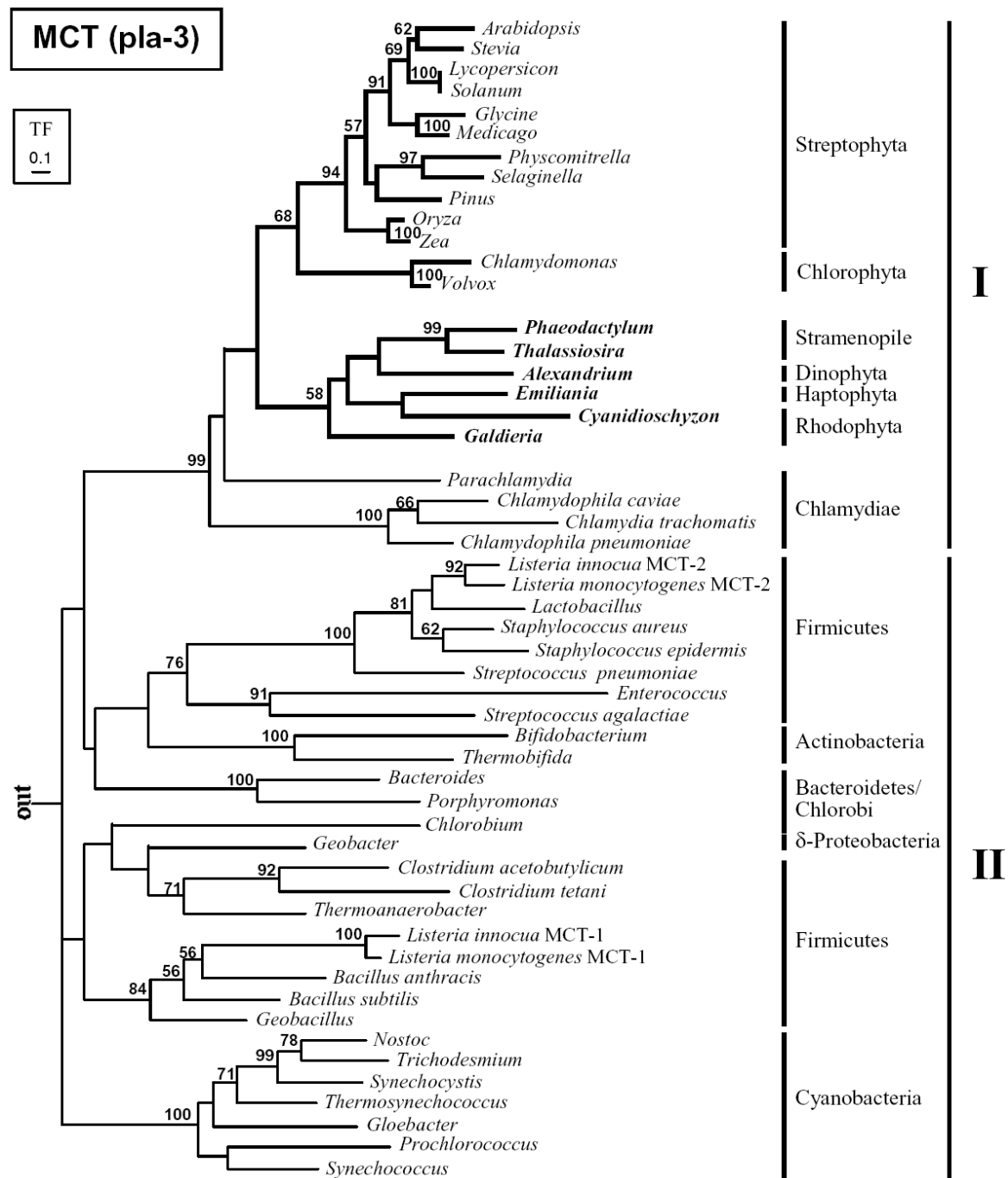


Abb. 41: Treefinder-Topologie der umfassenden ML-Analyse der MCT (pla-3) mit 81 Sequenzen. out: Außengruppe der 29 divergenten Sequenzen aus Actinobacteria und α-, β- und γ-Proteobacteria. **TF:** Treefinder.

1



- 165 -

7.8.7 Phylogenetische Analyse der CMK (pla-4)

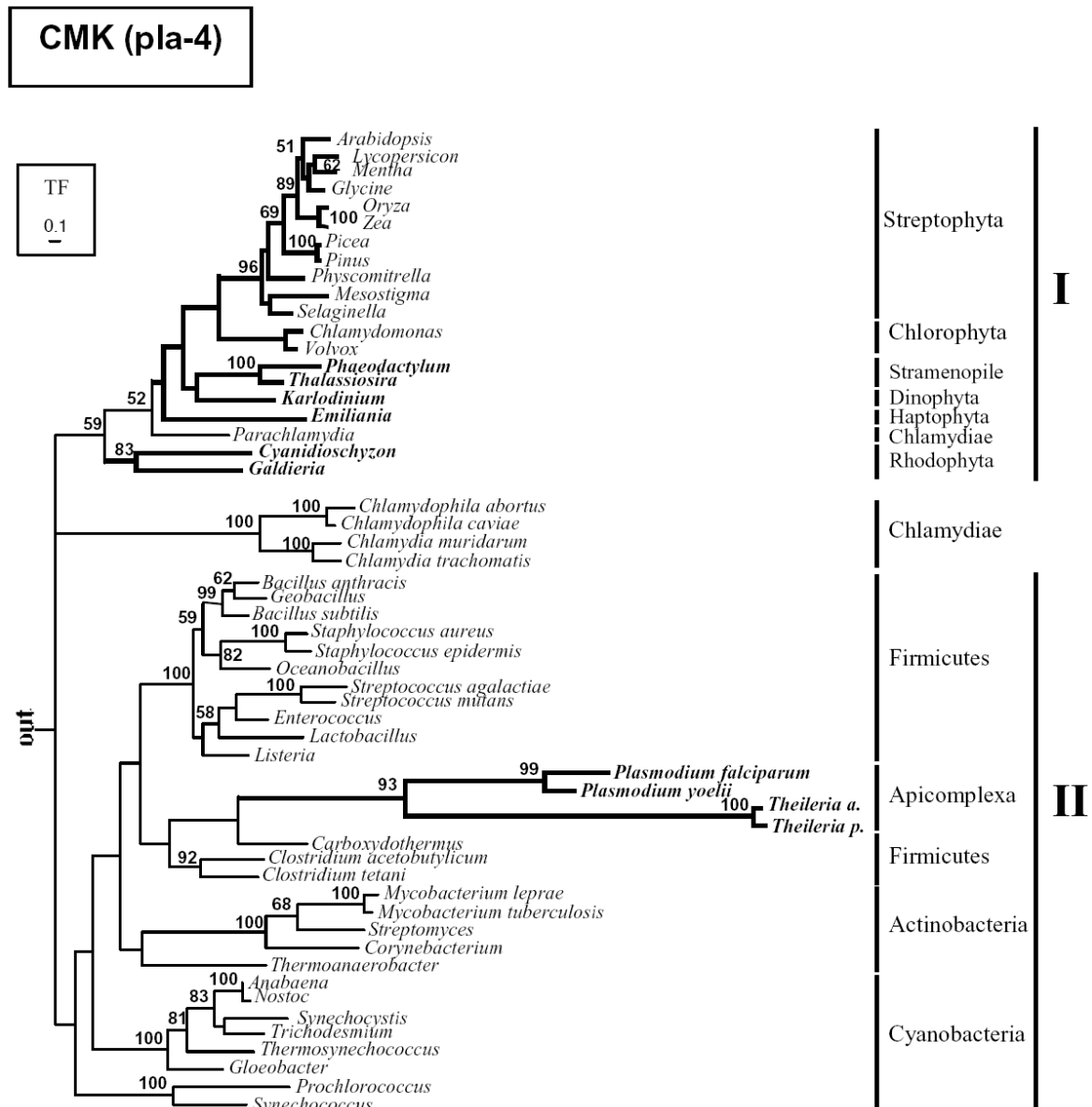


Abb. 43: Treefinder-Topologie der umfassenden ML-Analyse der CMK (pla-4) mit 84 Sequenzen. out: Außengruppe der 29 divergenten Sequenzen aus Spirochaetes, Bacteroidetes/Chlorobi und Proteobacteria. **TF:** Treefinder.

Die umfassende Analyse der CMK in Abbildung 43 umfasst 24 eukaryotische und 60 Prokaryotische Sequenzen. Die Außengruppe besteht aus den 29 divergenten Sequenzen von Vertretern der Spirochaetes, der Bacteroidetes/Chlorobi-Gruppe und der α -, β -, γ -, und δ/ϵ -Proteobacteria. Die Analyse zeigt eine statistisch mäßig unterstützte Zweiteilung in einen Eukaryotischen Ast der Gruppe I, in dem auch die Sequenz aus Parachlamydia gruppiert, und einen prokaryotischen Ast II.

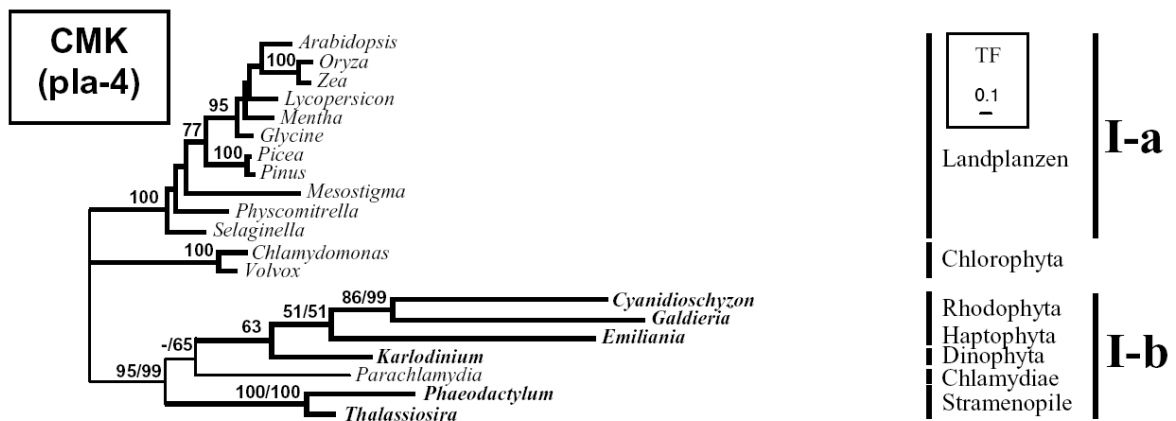


Abb. 44: Subanalyse des Teilstammbaums I der CMK. TF: Treefinder.

Die Position der Apicomplexa innerhalb der Prokaryoten wird statistisch nicht unterstützt und ist auf LBA zurückzuführen. Die Subanalyse des photosynthetischen Astes in Abbildung 44 zeigt eine distinkte Unterteilung in Streptophyta, Chlorophyta und Rhodophyta/komplexe Algen mit roten Plastiden. Die Bootstrap-Werte in Abbildung 44 sind für die hier gezeigte Topologie und in Ast I-b zusätzlich für die Analyse nach Eliminierung der partiellen Sequenz aus *Karlodinium* angegeben. Die Unterstützung für einen gemeinsamen Ursprung dieser Sequenzen steigt dann auf 99% BP.

7.8.8 Phylogenetische Analyse der MECPS (pla-5)

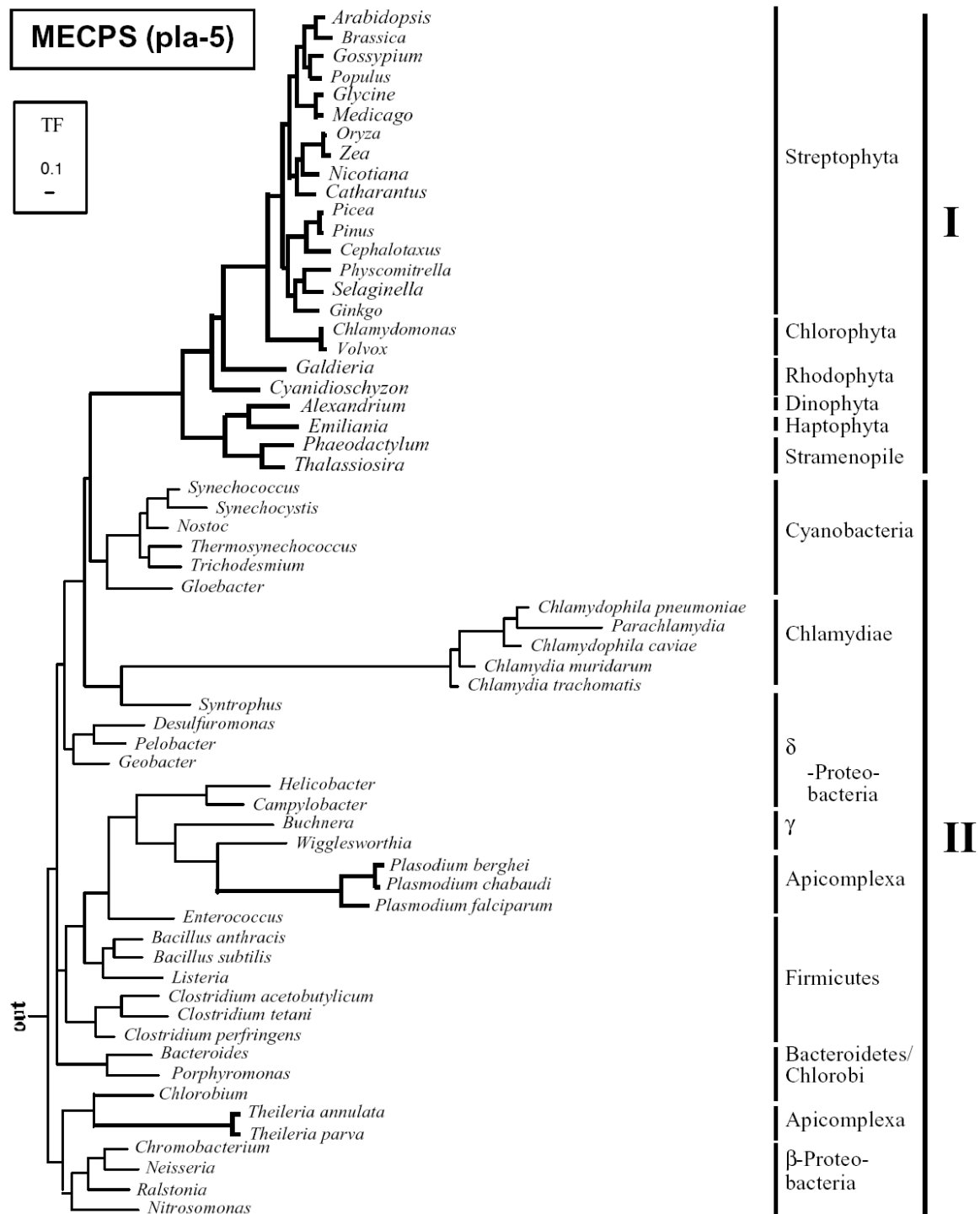


Abb. 45: Treefinder-Topologie der umfassenden ML-Analyse der MECPS (pla-5) mit 86 Sequenzen. out: Außengruppe der 24 divergenten Actinobacteria, α- und γ-Proteobacteria. TF: Treefinder.

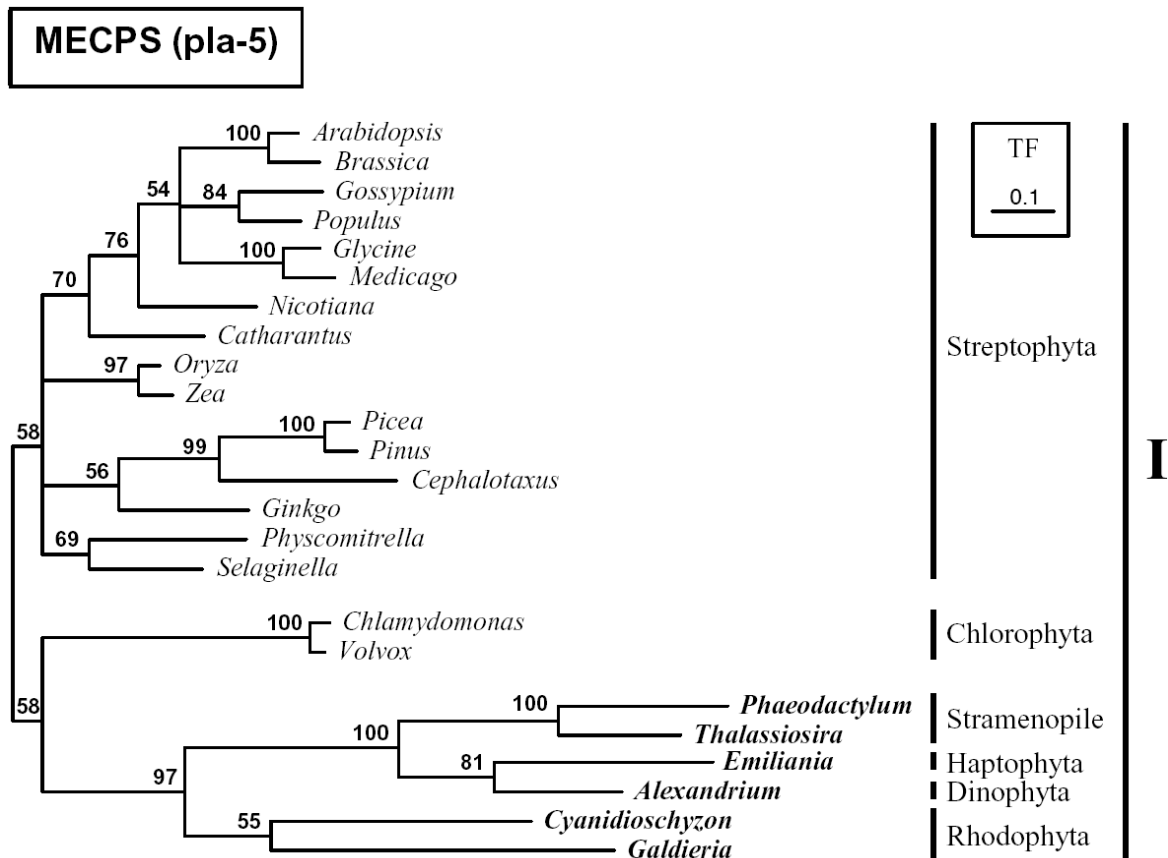


Abb. 46: Subanalyse des Teilstammbaums I der MECPS. TF: Treefinder.

Die umfassende Analyse der MECPS (pla-5) in Abbildung 45 enthält 29 Sequenzen aus Eukaryoten und 57 Sequenzen aus Eubakterien. Die 24 divergenten Sequenzen aus Actinobakterien sowie α - und γ -Proteobakterien dienten als Außengruppe zum Wurzeln des Baums. Die Topologie zeigt eine Zweiteilung des Baums in eine eukaryotische Gruppe I sowie eine Gruppe II mit prokaryotischen Sequenzen. Die MECPS aus den Apicomplexa gruppieren hier polyphyletisch innerhalb der prokaryotischen Sequenzen, was auf einen sekundären Erwerb dieser Gene durch HGT hindeutet.

Abbildung 46 zeigt die Subanalyse des eukaryotischen Astes, die eine starke statistische Unterstützung für einen gemeinsamen Ursprung der Rotalgen/komplexen Algen mit roten Plastiden zum Ausschluss der grünen Linie liefert.

7.8.9 Phylogenetische Analyse der HDS (pla-6)

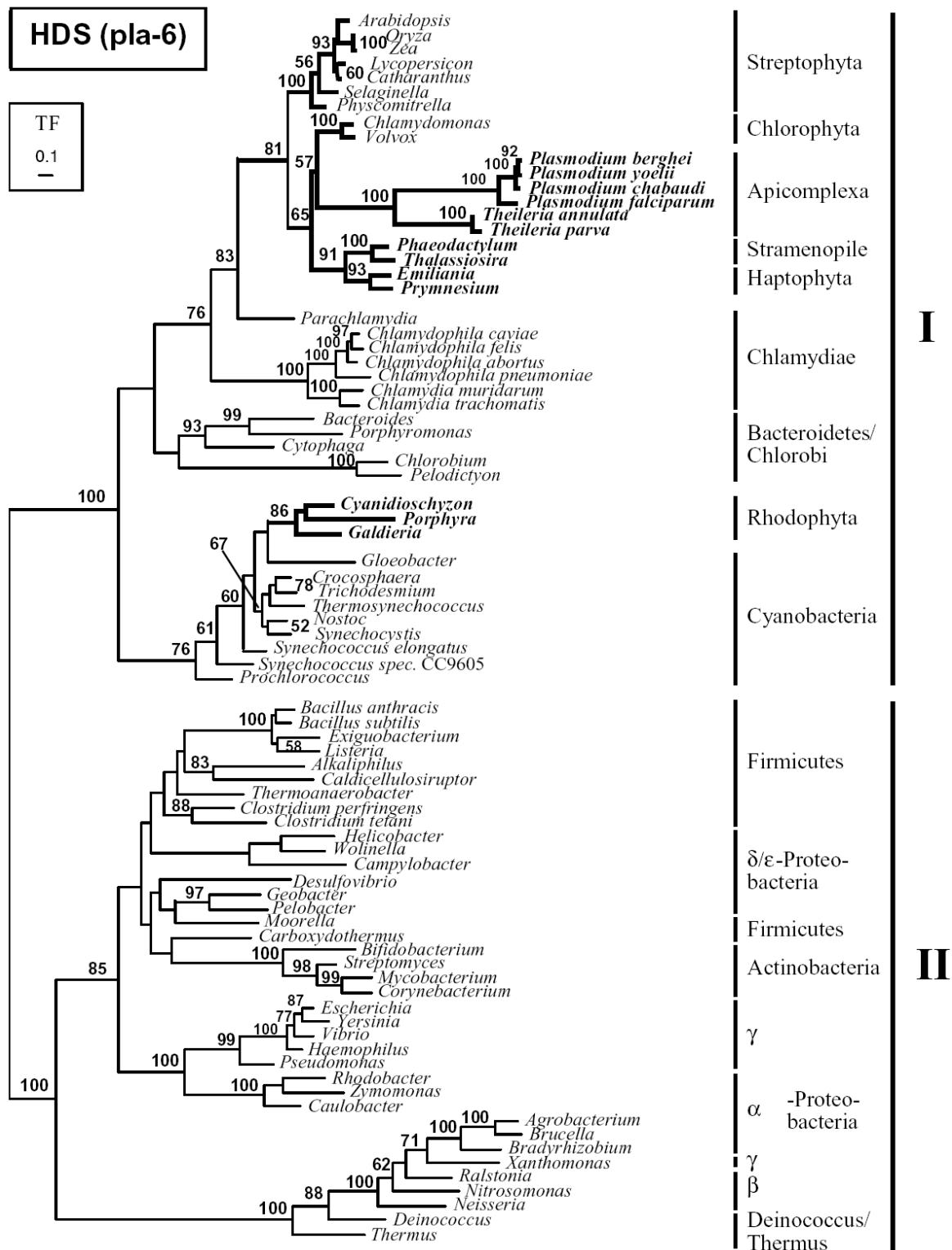


Abb. 47: Treefinder-Topologie der umfassenden ML-Analyse der HDS (pla-6) mit 81 Sequenzen. TF: Treefinder.

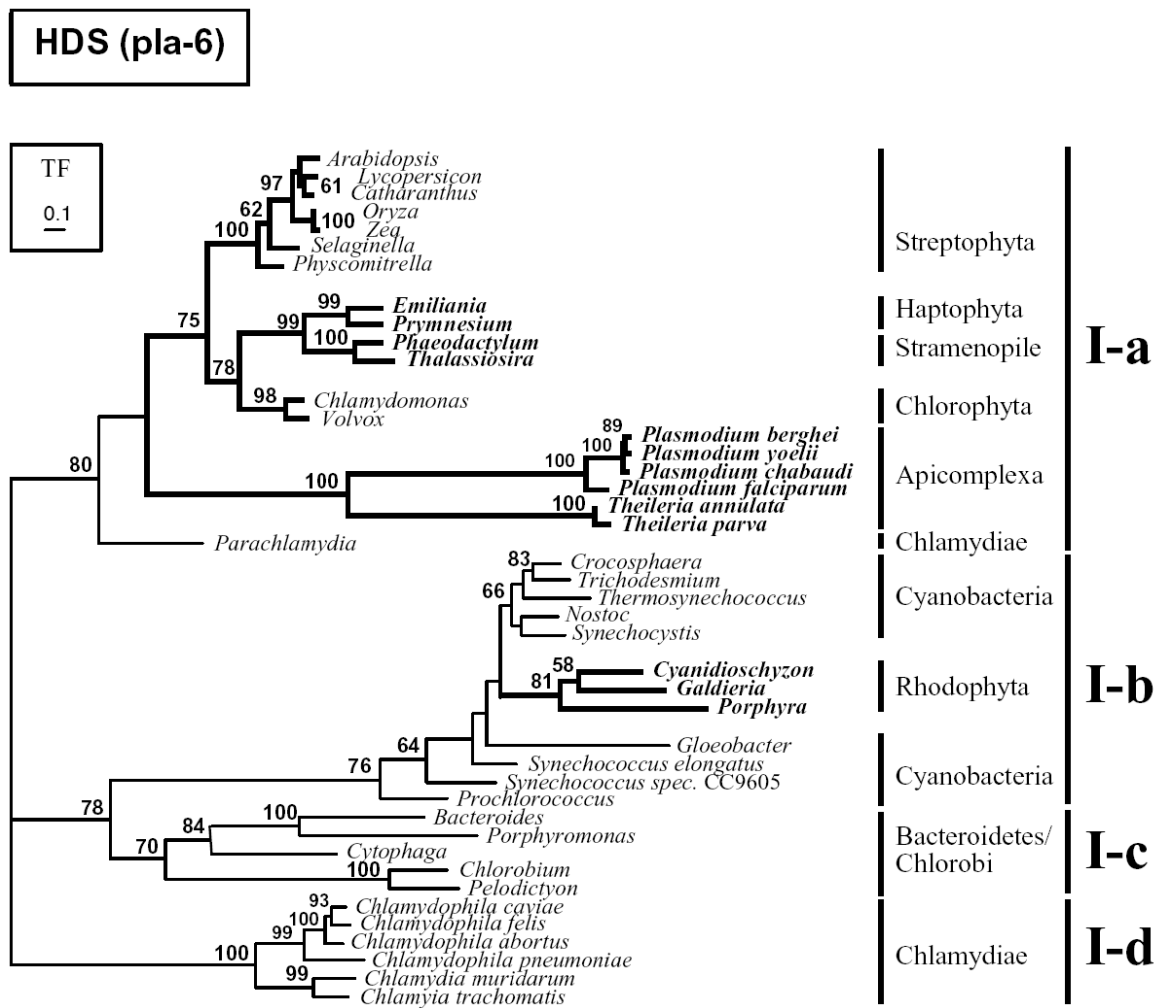


Abb. 48: Subanalyse des Teilstammbaums I der HDS. TF: Treefinder.

Die umfassende Analyse der HDS in Abbildung 47 besteht aus 22 eukaryotischen und 59 prokaryotischen Sequenzen. Die Topologie zeigt eine statistisch eindeutige Zweiteilung in einen Teilstammbaum I, in dem die Sequenzen aller Eukaryoten, der Chlamydien und der Cyanobakterien vertreten sind, sowie einen Teilstammbaum II, der ausschließlich eubakterielle Sequenzen enthält.

Die Subanalyse des Teilstammbaums I in Abbildung 48 zeigt eine gemeinsame Gruppierung der grünen Linie zusammen mit den komplexen Algen mit roten Plastiden, den Apicomplexa und *Parachlamydia*, wohingegen die Sequenzen der Rotalgen aus den Cyanobakterien stammen. Eine Assoziation der eukaryotischen Sequenzen mit den restlichen Vertretern der Chlamydien wird nicht unterstützt.

Danksagung

Mein großer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. Jörn Petersen für seine stets engagierte und hilfsbereite Art, für die immer offene Tür, für die jederzeit vorhandene Bereitschaft zu sehr konstruktiven Diskussionen, sowie für die verständnisvolle und entgegenkommende Handhabung der gemeinsamen Fehlereliminierung in diesem "Pamphlet" in den letzten Monaten. Ich danke Dir für die jahrelange fürsorgliche Kaffee-, Kuchen- und Keks-Versorgung und für unzählige spaßige Stunden nach Feierabend!

Herrn Prof. Dr. Rüdiger Cerff danke ich für die Bereitstellung meines großzügigen Arbeitsplatzes und für die freundliche Übernahme des Referats.

Herrn Prof. Dr. Michael Wettern danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft bin ich dankbar für die Finanzierung dieser Arbeit im Rahmen des Projekts "Die Stellung der Haptophyten im System der sekundären Rotalgen: Genetische Integration von Endosymbiont und Wirtszelle auf der Ebene des Grundstoffwechsels." (CE 1/27-1).

Herrn Dr. Robert Hänsch danke ich für die geduldige und freundliche Hilfe bei den LSM-Aufnahmen; Frau Dr. Marie Françoise Liaud danke ich für wertvolle Tipps sowie dafür, dass ich ihre *Phaeodactylum* cDNA-Bank nutzen durfte.

Bei Ulrike Brandt, Tatjana Stolz und Sarina Scharbatke möchte ich mich für die ausgezeichnete, immer sehr engagierte technische Unterstützung bedanken. Ulrike, danke für die vielen Beine, die Du Dir jeden Tag für alle ausgerissen hast.

Kollesche René Teich und Carolina Río Bártulos danke ich für fünf schöne, immer lustige, abwechslungsreiche und kollegiale Jahre, und für die viele Hilfe in allen möglichen Angelegenheiten innerhalb und außerhalb des Labors.

Meinen Ersatzfamilien Walther und Rotthues/Voss danke ich für die viele Wärme, mit der sie mich aufgenommen haben, und für die andauernde Freundschaft und Unterstützung!

Alex, Dir danke ich fürs Halten und Aushalten, und dafür, dass Du der ganzen Übung einen Sinn gibst!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Carina Grauvogel
Geburtsdatum	12. August 1977
Geburtsort	Saarbrücken
Familienstand	Ledig

Schulausbildung

08/88-07/95	Gymnasium am Rotenbühl, Saarbrücken
08/95-06/97	Willi-Graf-Gymnasium, Saarbrücken
	Abschluss: Abitur (Note: 1,3)

Studium

10/97-09/99	Studium der Biotechnologie an der TU Braunschweig
10/99-10/03	Studium der Biologie an der TU Braunschweig
	Diplomarbeit am Institut für Genetik (Prof. Cerff): „Molekulare und phylogenetische Charakterisierung zweier glykolytischer Enzyme (Glucose-6-phosphat Isomerase und Pyruvat Kinase) in Glaucocystophyten, primären und sekundären Rotalgen“
	Abschluss: Diplom (Note: Sehr gut)

Berufliche Laufbahn

11/03-08/06	Wissenschaftliche Angestellte in Forschung und Lehre mit Ziel der Promotion am Institut für Genetik, TU Braunschweig (Prof. Dr. Cerff)
Seit 09/06	Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Postdoc) am Chemotherapeutischen Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus in Frankfurt/Main (Dr. Grez)

Publikationen

Grauvogel C, Reece KS, Brinkmann H, Petersen J (2006). Plastid isoprenoid metabolism in the oyster parasite *Perkinsus marinus* connects dinoflagellates and malaria pathogens - new impetus for studying alveolates. J Mol Evol, eingereicht.

Grauvogel C, Petersen J (2005). Glykolytische Gene und der Ursprung komplexer Algen. 10. wissenschaftliche Tagung der Sektion Phykologie in der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Königswinter. (Vortrag)

Teich R, Grauvogel C, Cerff R, Petersen J (2004). The Phylogenetic Position of Haptophytes according to Genes for the Primary Metabolism. Botanikertagung, Braunschweig. (Poster)